



Instituto de Investigaciones Biotecnológicas

“Dr. Rodolfo Ugalde”

IIB-UNSAM-CONICET

Relación entre la estructura y la función de M6a: endocitosis y reciclado

Tesista: Lic. Micaela Daiana Garcia

Directora: Dra. Camila Scorticati

Co-director: Dr. Alberto C. C. Frasch

Marzo 2019

Tesis para optar por el título de Doctora en Biología Molecular y
Biotecnología

ÍNDICE

Índice.

ÍNDICE	3
Índice.	5
Índice de figuras y tabla:	7
RESUMEN Y ABSTRACT	11
Resumen.	13
Abstract.	15
PUBLICACIONES.....	17
ABREVIATURAS	19
INTRODUCCIÓN.....	25
Familia de las proteínas proteolipídicas (PLPs).	27
Proteína proteolipídica, PLP ó lipofilina.	28
La glicoproteína de membrana M6b.....	30
La glicoproteína de membrana M6a.	32
Plasticidad neuronal.....	36
Plasticidad neuronal asociada a M6a.....	37
Relación entre la estructura y la función de M6a.	43
M6a y las tetraspaninas.	46
Red endocítica.....	47
Endocitosis neuronal.	49
Endocitosis mediada por clatrina.....	51
Endocitosis independiente de clatrina.	53
Vías endocíticas y de reciclado.	54
Proteínas de la familia proteolipídica y endocitosis.	56
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	59
Hipótesis.	61
Objetivo principal.....	61
Objetivos específicos.....	61
MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
Animales.	65
Reactivos y anticuerpos.....	65
Plásmidos.....	66
Cultivos celulares y transfección.....	67
Cultivo primario de neuronas de hipocampo.....	67
Transfección de neuronas.	67
Cultivo de la línea celular HEK293.....	68
Transfección de células HEK293.	68
Internalización mediada por anticuerpo (AIA).	69
Cuantificación del porcentaje de M6a en la superficie celular.	70
<i>Cuantificación de la colocalización de M6a con distintas proteínas de las membranas endosomales luego del AIA.</i>	71
Inmunofluorescencia.	71
Inmunofluorescencia para cuantificación de sinapsis.....	72

Procesamiento de imágenes.....	73
Adquisición de imágenes.....	73
Generación de perfiles RGB.....	73
Cuantificación del porcentaje de M6a en la superficie celular en células HEK293.....	74
Cuantificación de la colocalización de M6a con distintas proteínas de membranas endosomales.....	74
Análisis y procesamiento de imágenes de sinapsis.....	75
Citometría de flujo.....	76
Cuantificación del porcentaje de M6a en la membrana plasmática neuronal.....	76
Cuantificación de la concentración de M6a por citometría de flujo en células HEK293-M6a-GFP.....	77
Centrifugación diferencial en gradientes discontinuos de sacarosa.....	78
Precipitación de proteínas.....	79
Detección de proteínas por <i>Western blot</i>.....	80
Análisis estadísticos.....	81
RESULTADOS.....	83
M6a se endocita luego del tratamiento neutralizante y esto se acompaña con la disminución del número de sinapsis en neuronas hipocampales.....	85
M6a endógena se endocita luego de una hora en presencia del anti-M6a-mAb en cultivo primario de neuronas.....	85
El número de acúmulos de sinaptofisina disminuye en neuronas hipocampales sometidas al AIA.....	88
El nivel de expresión de las proteínas sinápticas, sinaptofisina y NMDA-R1, no se modifica con el AIA.....	93
El porcentaje de M6a en la superficie celular disminuye luego de una hora en presencia del anti-M6a-mAb.....	94
La endocitosis de M6a es dependiente de vesículas revestidas por clatrina.....	100
M6a posee motivos lineales basados en tirosina susceptibles a la EMC.....	105
Los endosomas revestidos de clatrina participan de la endocitosis de M6a.....	106
La tirosina en la posición 251 de M6a participa de su endocitosis.....	113
M6a endocitada es dirigida a endosomas de reciclado y una parte a endosomas degradativos.....	116
Centrifugación diferencial: evaluación del destino de M6a endocitada.....	116
M6a endocitada se encuentra en endosomas tempranos (Rab5 y EEA1 positivos) y de reciclado lento (Rab11 positivos).....	120
M6a endocitada se encuentra en endosomas tardíos (Rab7 positivos) y del tipo degradativo (LAMP-1 positivos).....	131
Parte de M6a endocitada podría ser degradada.....	134
DISCUSIÓN.....	139
CONCLUSIONES.....	155
BIBLIOGRAFÍA.....	159
AGRADECIMIENTOS.....	171
NOTAS.....	175

Índice de figuras y tabla:

Figura 1: La vía de endocitosis y reciclado de la glicoproteína M6a está relacionada con la formación y el mantenimiento de sinapsis en neuronas de hipocampo.	14
Figura 1': The endocytosis/recycling pathway of the glycoprotein M6a is linked to the formation and maintenance of synapses in hippocampal neurons.	15
Figura 2: Representación esquemática de la familia de las proteínas proteolipídicas según predicciones topográficas.	27
Figura 3: Estadios de desarrollo de neuronas de hipocampo in vitro.	38
Figura 4: Vías endocíticas de células eucariotas.	48
Figura 5: Destino celular de una proteína endocitada.	53
Figura 6: Inmunointernalización mediada por anticuerpo (Antibody internalization assay: AIA).	86
Figura 7: M6a se endocita y luego del WO _{4h} se localiza en la membrana plasmática.	87
Figura 8: La endocitosis de M6a mediada por el anti-M6a-mAb disminuye la inmunomarcación de sinaptofisina.	89
Figura 9: El tratamiento con el anti-M6a-mAb disminuye significativamente el número de clústeres de sinaptofisina.	90
Figura 10: M6a se endocita y luego del WO _{20h} se localiza en la membrana neuronal.	91
Figura 11: La internalización de M6a disminuye la marca de sinaptofisina y NMDA-R1 en neuronas de hipocampo.	92
Figura 12: La internalización de M6a provoca la disminución de las sinapsis que se ve revertida con el WO _{20h}	93
Figura 13: La abundancia de las proteínas sinápticas no varía en neuronas de hipocampo sometidas al AIA.	94
Figura 14: Esquema de inmunointernalización de M6a mediado por el anti-M6a-mAb.	95
Figura 15: Gráfico de dot plot obtenido por citometría de flujo de neuronas de 5 DIV.	96
Figura 16: Histogramas representativos de intensidad de fluorescencia verde obtenidos por citometría de flujo de neuronas de 5 DIV.	97
Figura 17: M6a se endocita y posiblemente se recicla en neuronas de hipocampo 1/2 DIV evaluados por citometría de flujo.	98
Figura 18: M6a endógena en neuronas de hipocampo maduras se endocita a T1 y luego del WO _{20h} se ubica en la membrana.	99
Figura 19: Incorporación del colorante vital 7-AAD en neuronas luego de ensayarlas por el AIA.	100
Figura 20: M6a-GFP se endocita en neuronas hipocámpales luego de una hora de tratamiento neutralizante.	102
Figura 21: La sobreexpresión de M6a en la línea celular HEK293 no afecta su comportamiento endocítico.	103
Figura 22: Porcentaje de M6a en la superficie a partir de células HEK293.	104

Tabla 1: Motivos lineales presentes en la secuencia de aminoácidos de M6a: motivos basados en tirosina.	105
Figura 23: Esquema hipotético de la vía de internalización de M6a por la vía de clatrina (EMC).	106
Figura 24: Clatrina comparte endosomas con M6a en la superficie celular y en vesículas en neuronas de hipocampo.	107
Figura 25: M6a colocaliza con clatrina en células HEK293.	108
Figura 26: Parte de M6a endocitada comparte endosomas transferrina positivos.	109
Figura 27: El tratamiento con MCD (metil- β -ciclodextrina) bloquea la internalización de M6a en células HEK293 sometidas al AIA.	110
Figura 28: El tratamiento con monensina bloquea la internalización de M6a en células HEK293 sometidas al AIA.	111
Figura 29: El tratamiento con filipina no altera la internalización de M6a mediado por el tratamiento neutralizante.	112
Figura 30: La tirosina en la posición 251 es requerida para la endocitosis de M6a.	114
Figura 31: La tirosina en la posición 251 es necesaria para la endocitosis de M6a.	115
Figura 32: Fraccionamiento subcelular de neuronas de hipocampo sometidas al AIA.	118
Figura 33: Western blot a partir del fraccionamiento subcelular de neuronas de hipocampo sometidas al AIA.	119
Figura 34: Vía endocítica de la transferrina acoplada a su receptor.	120
Figura 35: M6a endocitada es dirigida hacia endosomas de reciclado en neuronas de hipocampo.	121
Figura 36: M6a endocitada es dirigida hacia endosomas de reciclado en células HEK293. .	122
Figura 37: M6a endocitada es enviada a endosomas tipo ácidos en neuronas de hipocampo.	123
Figura 38: M6a endocitada es enviada a endosomas tipo ácidos en células HEK293.	124
Figura 39: M6a endocitada es dirigida hacia endosomas tempranos Rab5 positivos en neuronas de hipocampo.	125
Figura 40: M6a endocitada es dirigida hacia endosomas tempranos Rab5 positivos en células HEK293.	125
Figura 41: M6a endocitada es dirigida hacia endosomas Rab5 positivos cuando Rab5 es sobreexpresada en neuronas de hipocampo.	126
Figura 42: M6a endocitada es dirigida hacia endosomas Rab5 positivos cuando Rab5 es sobreexpresada en células HEK293.	127
Figura 43: M6a endocitada es dirigida hacia endosomas EEA-1 positivos en neuronas de hipocampo.	128
Figura 44: M6a endocitada es dirigida hacia endosomas EEA-1 positivos en células HEK293.	128
Figura 45: M6a endocitada es dirigida hacia endosomas de reciclado lento Rab11 positivos en neuronas de hipocampo.	130

Figura 46: M6a endocitada es dirigida hacia endosomas de reciclado lento Rab11 positivos en células HEK293.....	130
Figura 47: M6a endocitada es dirigida hacia endosomas tardíos Rab7 positivos en neuronas de hipocampo.	131
Figura 48: M6a endocitada es dirigida hacia endosomas tardíos Rab7 positivos en células HEK293.....	132
Figura 49: Una proporción de M6a endocitada se encuentra en endosomas LAMP-1 positivos.	133
Figura 50: Una proporción de M6a endocitada se encuentra en endosomas LAMP-1 positivos cuando se las coexpresa.....	133
Figura 51: Los niveles de M6a en neuronas de 15 DIV sometidas al AIA no se modifican.	135
Figura 52: La concentración de M6a total disminuye en células HEK293 sometidas al AIA evaluado por Western blot.....	136
Figura 53: La concentración de M6a total disminuye en células HEK293 sometidas al AIA evaluado por citometría de flujo.....	137

RESUMEN Y ABSTRACT

Resumen.

La glicoproteína de membrana M6a se encuentra asociada a enfermedades neuropsiquiátricas como la depresión, la esquizofrenia y fallas en el aprendizaje. Se ha descrito que contribuye positivamente en la extensión de neuritas, el crecimiento axonal, la formación de filopodios/espinas y el mantenimiento de las sinapsis. M6a posee cuatro pasos de transmembrana, dos bucles extracelulares, uno mayor (EC2) y uno menor (EC1) y los extremos citoplasmáticos hacia el interior celular. Dos cisteínas presentes en su EC2, que forman un puente disulfuro, mostraron ser esenciales para el reconocimiento antigénico del anti-M6a-mAb. Este anticuerpo fue descrito como neutralizante porque ha sido capaz de bloquear la extensión de neuritas mediada por M6a. Por otro lado, se ha determinado, por coimmunoprecipitación, que M6a interactúa directa o indirectamente con clatrina. Sin embargo, el mecanismo preciso por el cual M6a se internaliza y se recicla aún no ha sido dilucidado. En este trabajo, utilizando ensayos *in vitro* controlados estudiamos la inmunointernalización de M6a mediada por el anti-M6a-mAb. Observamos que luego de una hora de tratamiento parte de M6a se endocita y disminuyen significativamente el número de sinapsis en neuronas de hipocampo. Cuando los niveles de M6a en la superficie celular se reestablecen, observamos que el número de sinapsis recupera sus valores normales. La internalización de M6a involucra a endosomas tempranos revestidos de clatrina. Probablemente ésta ocurra por la asociación entre la proteína adaptadora 2 y el “motivo basado en tirosina” ²⁵¹YEDI²⁵⁴ ubicado en el extremo C-terminal de M6a. Luego de su endocitosis, M6a es dirigida hacia endosomas tempranos característicos, Rab5- y EEA1-positivos. Posteriormente es dirigida o bien hacia la membrana a través de endosomas Rab11 positivos o bien hacia la vía degradativa mediada por endosomas Rab7 y LAMP-1 positivos. Nuestros resultados muestran que los niveles de M6a en la superficie celular neuronal modifican la formación y mantenimiento de las sinapsis, sin alterar los niveles de proteínas de las proteínas sinápticas estudiadas (sinaptofisina y el receptor de alta afinidad por glutamato, N-metil-D-aspartato receptor tipo 1). Este mecanismo novedoso podría ser relevante durante el desarrollo neuronal, el poda sináptico y/o podría estar involucrado en diversos desórdenes neurológicos en donde la sinapsis se encuentra comprometida.

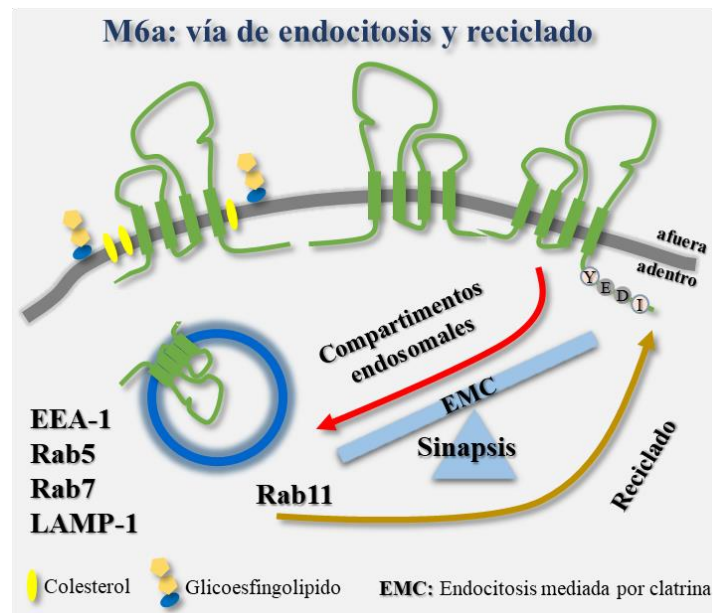


Figura 1: La vía de endocitosis y reciclado de la glicoproteína M6a está relacionada con la formación y el mantenimiento de sinapsis en neuronas de hipocampo.

Abstract.

The neuronal glycoprotein M6a has been associated with psychiatric disorders such as, depression, learning disabilities and schizophrenia. In cultured neurons, M6a positively contributes to neurite extension, axon guidance, filopodia/spine outgrowth, and synapse formation. The endocytic processes of neuronal membrane proteins are linked to the differentiation, growth, signalling and plasticity of neurons. However, the roles of M6a and the precise mechanisms through which M6a internalizes and recycles back to the neuronal membrane are unknown. Here, by using a controlled *in vitro* assay, we showed whether M6a is endocytosed, the number of synapses in hippocampal neurons decreases. When re-establishing the levels of M6a at the cell surface, the number of synapses returned to its normal values. M6a internalization involves clathrin-coated pits, probably by the association between the adaptor protein 2 and the ²⁵¹YEDI²⁵⁴ “tyrosine-based” motif located within the C-tail of M6a. Upon endocytosis, M6a is sorted to early endosome antigen 1- and Rab5-positive endosomes and, then sorted back to the cell surface via Rab11-positive endosomes or to degradation via Rab7 and, finally LAMP-1-positive endosomes. Our results demonstrated that the levels of M6a at the cell surface modified the formation/maintenance of synapses, without altering the protein levels of synaptophysin or N-methyl-D-aspartate receptor type-1. This novel mechanism might be relevant during neuronal development, pruning and/or many of the mental disorders in which the number of synapses is affected.

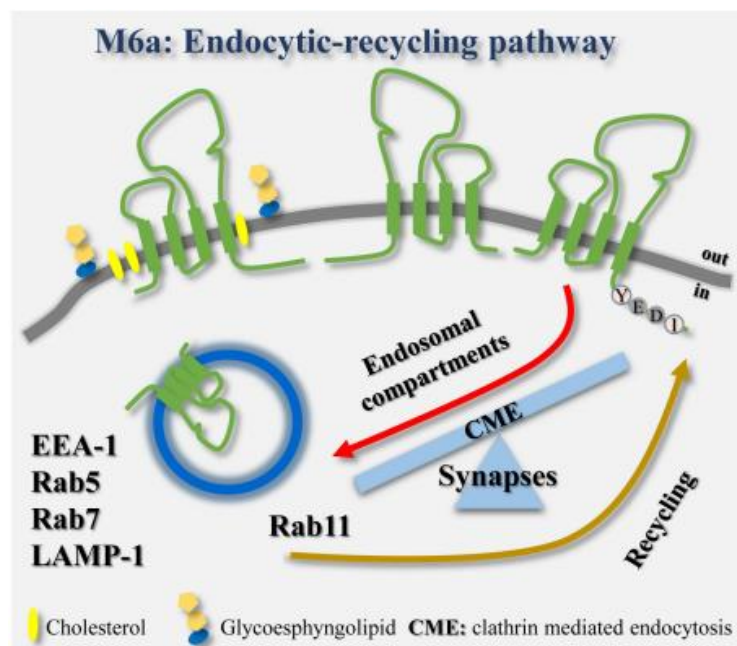


Figura 1': The endocytosis/recycling pathway of the glycoprotein M6a is linked to the formation and maintenance of synapses in hippocampal neurons.

PUBLICACIONES.

- “*Filopodia formation driven by Membrane Glycoprotein M6a depends upon the self-interaction of its Transmembrane Domains*”. Formoso K, **Garcia MD**, Frasch ACC and Scorticati C. (Journal of Neurochemistry, Volume 134, Issue 3, pages 499–512, August 2015).
- “*Evidence for the Role of Glycoprotein M6a in Dendritic Spine Formation and Synaptogenesis*” K. Formoso, **M. D. Garcia**, A. C. Frasch y C. Scorticati. (Journal of Molecular and Cellular Neuroscience, Volume 77, pages 95-104, October 2016).
- “*The membrane glycoprotein M6a endocytic/recycling pathway involves clathrin-mediated endocytosis and affects neuronal synapses*” **Garcia, MD**; Formoso, K; Aparicio, GI; Frasch, ACC; Scorticati, C. (September 2017. Frontiers in Molecular Neuroscience. doi: 10.3389/fnmol.2017.00296)

ABREVIATURAS

7-AAD: 7-aminoactinomicina D.

ADBE: *Activity-Dependent Bulk Endocytosis*.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AIA: *Antibody Internalization Assay* o endocitosis mediada por anticuerpo.

AKT: Proteína quinasa B.

Ank-2: Ankirina 2.

ANOVA: *Analysis Of Variance* o análisis de varianza.

Anti-M6a: Anticuerpo policlonal hecho en conejo que reconoce el extremo C-terminal de M6a.

Anti-M6a-mAb: Anticuerpo monoclonal que reconoce el bucle extracelular mayor (EC2) de M6a (comercial).

AP-1: Proteína adaptadora de clatrina tipo 1.

AP-2: Proteína adaptadora de clatrina tipo 2.

AP-3: Proteína adaptadora de clatrina tipo 3.

ARN: Ácido ribonucleico.

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro.

BSA: Sero-albúmina bovina.

CA1-4: *Cornu Ammonis* 1 al 4.

Camk2: Calcio calmodulina quinasa II.

CD63: *Mast cell antigen AD1*.

CLK-1: Cyclin Dependent kinase I: like kinase 1.

CNX: Calnexina.

COS-7: Línea celular de fibroblasto de riñón de mono.

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol.

DIV: Días *in vitro*.

DM20: *Splicing* alternativo de PLP.

DMEM: Medio de cultivo: **D**ulbeco's **M**odified **E**agles **M**inimal essential medium.

E10: Estadio embrionario día diez.

EA: Enfermedad de Alzheimer.

EC1: Dominio (bucle) extracelular 1 (menor).

EC2: Dominio (bucle) extracelular 2 (mayor).

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

EE: *Early Endosome* o endosoma temprano.

EEA-1: *Early Endosomal Antigen 1* o antígeno asociado al endosoma temprano-1.

EGFP: Proteína fluorescente verde mejorada o GFP.

EGTA: Etilen glicol-bis(β -aminoetil éter)-N,N,N',N'- ácido tetraacético.

EIC: Endocitosis independiente de clatrina.

ELM: *Eukaryotic Linear Motif* o motivos lineales eucariotas.

EMC: Endocitosis mediada por clatrina.

FBS: Suero fetal bovino.

FC: Citometría de flujo.

FC: Fluorescencia citoplasmática.

FL1-3: Canal de adquisición de fluorescencia, FL1 verde y FL3 rojo lejano.

FSC: *Forward scatter*.

FT: Fluorescencia total.

Fyn: *Tyrosine-protein kinase Fyn* o tirosina quinasa Fyn.

GDP: Guanosin difosfato.

Gpm6a: Gen que codifica a la proteína M6a de ratón/rata.

GPM6A: Gen que codifica a la proteína M6a humana.

Gpm6b: Gen que codifica a la proteína M6b de ratón/rata.

GPM6B: Gen que codifica a la proteína M6b humana.

GTP: Guanosina trifosfato.

GTPasas: Guanosina trifosfatasa o trifosfatasa de guanosina.

HEK-293: Línea celular embrionaria de riñón humano 293.

HEPES: 4-(2-hidroxietil)-1-ácido piperazinetanosulfónico.

HRP: Peroxidasa de rabanito.

iARN: ARN de interferencia.

IC: Dominio (bucle) intracelular.

IgG: Inmunoglobulina G.

LAMP-1: Proteína asociada a la membrana del lisosoma-1.

LE: *Late Endosome* o endosoma tardío.

Lys: Lisosoma.

MAP-2: *Microtubule Associated Protein 2*.

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos.

mARN: ARN mensajero.

MCD: Metil- β -ciclodextrina.

MDCK: *Madin-Darby Canine Kidney* o Línea celular de epitelio de riñón canino Madin-Darby.

MES: Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico.

Mona: Monensina.

MOPr: Receptor μ -opioide.

MVB: *Multivesicular Body* o cuerpos multivesiculares.

N2a: Línea celular neuroblastoma murino Neuro-2a.

NB: Neurobasal.

NGF: *Nerve Growth Factor* o factor de crecimiento nervioso.

NMDA-R1: Receptor de N-metil-D-aspartato tipo 1.

nsSNP: Polimorfismo no sinónimo de un solo nucleótido.

OMIM: *Online Mendelian Inheritance in Man*.

OPTIMEM: Medio MEM.

PAEZ: Zona pre-axonal de exclusión de vesículas endocíticas.

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida.

PBS: Buffer fosfato salino.

PC12: Línea celular de feocromocitoma de médula adrenal de rata.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

PEI: Polietilenimina.

PFA: Paraformaldehído.

PI3K: Fosfatidilinositol-3 quinasa.

PLP: Proteína proteolipídica.

Plp1: Gen que codifica a PLP de ratón/rata.

PLP1: gen que codifica a PLP humana.

PMD: Enfermedad desmielinizante Pelizaeus-Merzbacher.

PNS: Post Nuclear Supernatant.

PSD: Post Synaptic Density.

qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa.

Rab: GTPasa de la superfamilia Ras.

RE: Retículo endoplásmico.

RFP: Proteína fluorescente roja.

RGB: Red, Green and Blue.

RhoA: GTPasa pequeña homóloga a la familia de Ras del tipo A.

ROI: *Region of interest* o región de interés.

RRP: *Readily releasable pool*.

SEM: *Standard error media* o error estándar de la media.

SERT: receptor de serotonina.

shARN: *short hairpin* ARN.

Sin: Sinaptofisina.

SNC: Sistema nervioso central.

Src: Src tirosina quinasa.

SSC: *Side scatter*.

T0: Tiempo inicial del experimento.

T1: Tiempo de una hora iniciado el experimento.

Tau-1: *Microtubule associated protein tau*.

TBS: Buffer Tris Salino.

TCA: Ácido tricloroacético.

TEM: *Tetraspanin enriched domain* o dominio rico en tetraspaninas.

Tf: Transferrina.

Tf-647: Transferrina conjugada con Alexa 647.

TFG- β : Factor de crecimiento transformante beta.

Tf-R: Receptor de transferrina.

TM: Dominio transmembrana.

Trk: Receptor tirosina quinasa.

TT: Tetraspanina.

Tub: Tubulina.

VAMP-2: *Vesicle Associated Membrane Protein 2* o proteína asociada a la membrana vesicular tipo 2.

WO₂₀: *Wash Out* de 20 h o 20 horas transcurridas del reemplazo del medio por uno fresco.

WO_{4h}: *Wash Out* de 4 h o 4 horas transcurridas del reemplazo del medio por uno fresco.

WT: Proteína silvestre.

ZA: Zona de actividad.

INTRODUCCIÓN

Familia de las proteínas proteolipídicas (PLPs).

La familia está compuesta por proteínas de membrana que comparten baja identidad de secuencia y alta homología estructural con la proteína proteolipídica o PLP (quién le da nombre a la familia). Los otros miembros son un *splicing* alternativo de PLP, llamado DM20, M6a y M6b (Yan, y col., 1996, Roussel, y col., 1998). Hasta la fecha no se han resuelto las estructuras cristalográficas de ninguno de los cuatro miembros de esta familia. Sin embargo, por análisis bioinformáticos, basados en la naturaleza aminoacídica, se ha predicho que contienen cuatro dominios de transmembrana (TM1-4), un bucle extracelular mayor EC2 (*extracellular domain* 2), uno menor EC1 (*extracellular domain* 1), un bucle intracelular (IC) y los extremos N- y C-terminales se encuentran en el citoplasma (Garbern, y col., 1999, Fuchsova, y col., 2009, Formoso, y col., 2016) (Figura 2). Las PLPs son las proteínas integrales de membrana más abundantes en el sistema nervioso central. Esto se basa en un estudio de predicciones integradas a partir distintas bases de datos de expresión de genes, que indican que, en el tejido cerebral humano, la abundancia de PLP es del 72 %, de M6a 71 % y de M6b 66 % (Huminiecki L, 2003).

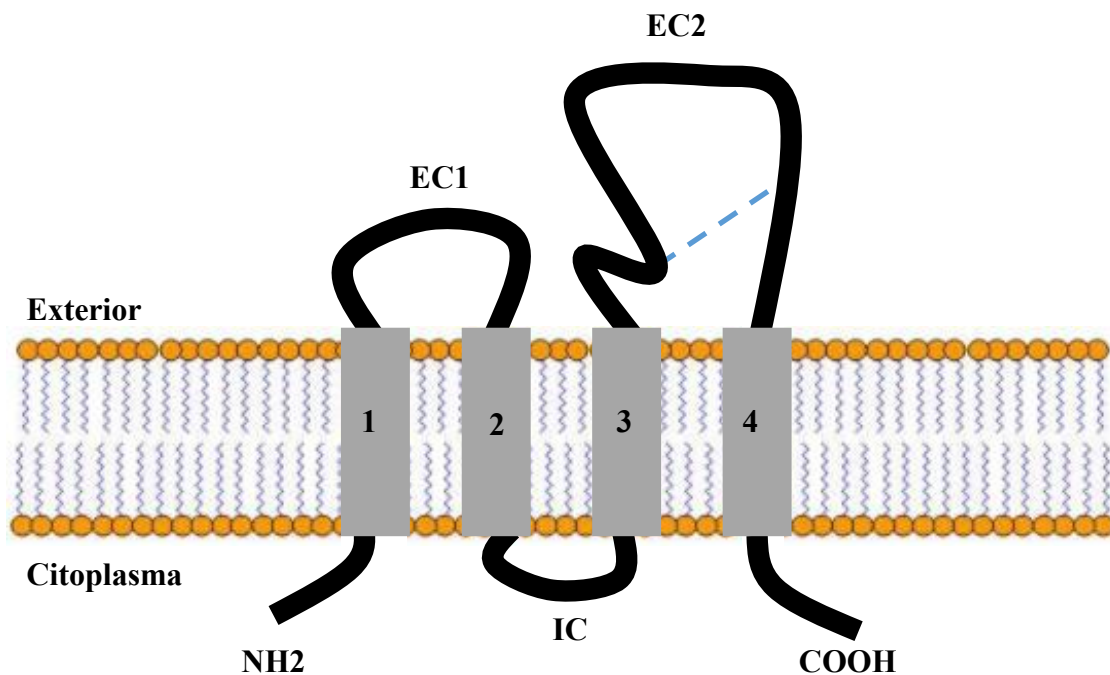


Figura 2: Representación esquemática de la familia de las proteínas proteolipídicas según predicciones topográficas. Se observan cuatro dominios transmembrana TM1-4, los bucles extracelulares menor (EC1) y mayor (EC2), un bucle intracelular (IC) y los extremos N- y C-terminales hacia el citoplasma.

En la bibliografía se propone que las PLPs podrían surgir de un gen ancestral común, postulando a M6b como un enlace evolutivo entre PLP y M6a (Werner, y col., 2001). Esto es

en parte porque, en el sistema nervioso central, M6b se expresa tanto en neuronas como en oligodendrocitos. Por el contrario, PLP se expresa en oligodendrocitos, mientras que M6a se expresa en neuronas (Yan, y col., 1996). Sumado a esto, se ha reportado que las distintas formas de *splicing* de M6b determinan, la presencia o ausencia, de distintos dominios en las distintas variantes (Werner, y col., 2013). Por otra parte, el enlace evolutivo de M6b con M6a se propone debido a la presencia de dominios homólogos a α y ω de M6b (74 % de identidad) en M6a. Estos dominios se corresponden en identidad de secuencia entre M6a y exón Ib, que define el dominio α en el extremo N-terminal de M6b, y el exón VII, que define el dominio ω en el extremo C-terminal de M6b. Mientras que el extremo N-terminal y el dominio ψ de M6b son homólogos a PLP/DM20. En este sentido, se han reportado diferentes isoformas de M6b que parten del *splicing* alternativo del gen que se conserva en los vertebrados (Werner, y col., 2001). Asimismo, el enlace evolutivo también le brinda a M6b propiedades similares a las de M6a y a las de PLP. Se ha descripto que M6b participa de la compactación de la mielina asistiendo a PLP en oligodendrocitos; mientras que en neuronas es capaz de formar protrusiones de membrana de manera similar a M6a. Se ha reportado la capacidad de DM20, pero no de PLP, de formar protrusiones de membrana en neuronas de hipocampo de rata (Griffiths, y col., 1998, Alfonso, y col., 2005b, Fernandez, y col., 2010, Werner, y col., 2013). Sumado a la capacidad de DM20 de generar la extensión de neuritas, en neuronas corticales provenientes de ratones deficientes en *Gpm6a*^{-/-} y *Gpm6b*^{-/-} ó *Gpm6b*^{Y/-} de forma similar que lo hace M6a ó M6b (Mita, y col., 2015). Los estudios de esta tesis se centran en el estudio de M6a.

Proteína proteolipídica, PLP ó lipofilina.

PLP, en humanos, está codificada en el gen *PLP1* que se encuentra ubicado en el cromosoma X locus Xq22 (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PLP1>, (Human Gene Database, 2018)) y se expresa abundantemente en los oligodendrocitos del SNC. Su peso molecular es de 30 kDa y la componen 277 aminoácidos. Además, sus funciones se centran en la promoción, asistencia y compactación de la mielina que recubre a los axones neuronales (Kramer-Albers, y col., 2006). Se encuentra reportado en bases de datos que PLP en humanos no sólo participa de la mielinogénesis sino que también participa en respuestas inflamatorias, desarrollo de los astrocitos y regulación positiva de la expresión de genes. Sumado a esto, se han desarrollado estudios de expresión proteica y se observó que PLP se encuentra principalmente en el cerebro, pulmones, células de Schwann, entre otros tejidos. Además, se ha descripto que tiene un rol esencial en la formación y mantenimiento de la estructura multilaminar de la mielina (Human Gene Database, 2018).

PLP tiene modificaciones postraduccionales, como palmitoilaciones, en sus extremos N- y C- terminales lo que le permiten anclarse a los microdominios de membrana tipo *lipid raft* (Kramer-Albers, y col., 2006, White and Kramer-Albers, 2014). Estos microdominios están altamente organizados y forman plataformas de señalización en la membrana plasmática. La participación de PLP en estos microdominios le otorga la posibilidad de ser endocitada por la vía independiente de clatrina (EIC), como se describirá más adelante (Simons, y col., 2000, Winterstein, y col., 2008). Se ha reportado que PLP posee un *splicing* alternativo que es DM20, la cual se expresa en estadios embrionarios en los oligodendrocitos. Luego, a lo largo del desarrollo, la expresión de DM20 disminuye y, de manera contraria, aumenta la expresión de PLP (LeVine, y col., 1990). Sumado a esto, por ensayos de *Western blot* se ha determinado que PLP es capaz de formar homodímeros en la membrana de los oligodendrocitos. Sin embargo, DM20 se la ha encontrado principalmente como monómeros (Daffu, y col., 2012).

En humanos, mutaciones reportadas en el gen de *PLP1* dan lugar a patologías como la enfermedad desmielinizante Pelizaeus-Merzbacher (PMD) (OMIM 312080 <http://omim.org/entry/312080>) o la Paraplejia Espástica tipo 2 (SPG2) (OMIM 312920 <http://omim.org/entry/312920>). En este sentido, hay descriptas más de 60 mutaciones puntuales en la región codificante de *PLP1* (nsSNPs) que provocan PMD. Sin embargo, son las duplicaciones de una porción del cromosoma X, que contiene al gen de PLP, las que causan el mayor porcentaje de casos de PMD (~ 60 %) (Garbern, y col., 1999, Garbern, 2005, 2007). Además, existen casos clínicos sintomáticos de PMD que no han mostrado mutaciones en la región codificante del gen. Esto último sugiere que podría deberse a mutaciones en las regiones regulatorias. Según el tipo de mutación y su ubicación, PMD tiene distintos grados de severidad que van desde suave, moderado a severo. Las variantes más severas están relacionadas con mutaciones no sinónimas que producen cambios de aminoácidos en las regiones transmembrana o bien en los *loops* o bucles extracelulares (Garbern, y col., 1999, Hobson and Garbern, 2012). Por su parte, la SPG2 también es generada por mutaciones puntuales en aminoácidos claves que afectan la interacción de PLP con el colesterol (Kramer-Albers, y col., 2006, Garbern, 2007).

Los estudios realizados en un modelo de ratones *knock out* de *plp1* (*plp1*^{-/-} ó *plp*^{Y/-}) no muestran desmielinización ni comportamiento alterado. La fertilidad de los animales no se ha visto alterada y las hembras homocigotas también han sido viables. Sin embargo, se han observado deficiencias en la compactación de la mielina (Klugmann, y col., 1997). El rol de PLP en células progenitoras de oligodendrocitos, en un modelo de ratón reside en su expresión diferencial a lo largo del desarrollo. En cortes histológicos, se observó que en estadios

embrionarios (E16.5) se expresa abundantemente. Esta expresión coincide con la migración lateral desde la zona ventricular hasta lo que se presume como materia blanca. Al momento del nacimiento del ratón se reprime la expresión de PLP y cuando es requerida la mielinización (postnatal 7, P7) se vuelve a expresar abundantemente. En un modelo de ratón, machos deficientes de *plp* (*plp*^{-Y}), ó *PLP-null*, se determinó que PLP es fundamental en la integridad estructural de los procesos, o extensiones de membrana de los oligodendrocitos. Estos procesos fueron evaluados en cortes histológicos de la médula espinal. Se determinó que los ratones *PLP-null* tienen una mayor proporción de procesos orientados al azar que los ratones silvestres (Harlow, y col., 2014). Existen trabajos que han reportado que la sobreexpresión de PLP en oligodendrocitos y células COS-7 induce el aumento de protrusiones de membrana (Werner, y col., 2013, Yaffe, y col., 2015). Por su parte, la sobreexpresión de DM20, en células cerebelares provenientes de ratones deficientes de M6a y M6b, produjo la extensión de neuritas de forma similar a M6a silvestre (Mita, y col., 2015). Mientras que, con la sobreexpresión de PLP y DM20, en neuronas provenientes de hipocampos de embriones de ratas, se observó un aumento de protrusiones de membrana del tipo filopodio sólo para DM20, como ya se mencionó (Fernandez, y col., 2010).

Es sabido que la exposición prolongada a situaciones estresantes puede causar consecuencias estructurales en el cerebro (Alfonso, y col., 2005a, Boks, y col., 2008). Esto se acompaña con la disminución de los niveles de expresión de DM20, no así los de PLP, en el hipocampo de ratones sometidos a estrés crónico/depresión. Además, el estrés es uno de los factores principales que disparan la depresión en humanos y se acepta que el estrés crónico murino es un buen modelo para el estudio de los mecanismos moleculares que subyacen en la depresión en humanos (Fernandez, y col., 2010). Sin embargo, en hipocampos provenientes de cerebros de pacientes post mórtem, con diagnóstico de depresión, no se observaron diferencias en la expresión de PLP (mARN) (Fuchsova, y col., 2015). Los antecedentes mencionados postulan a PLP como un gen que no está asociado a la respuesta a estrés de forma contraria a lo que ocurre con M6a y M6b como se describirá más adelante.

La glicoproteína de membrana M6b.

La proteína M6b está codificada en el gen *GPM6B*, ubicado en el cromosoma X en el locus Xp22.2 (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GPM6B>, (Human Gene Database, 2018)) y se expresa tanto en glía como en neuronas, del SNC como ya se mencionó. Su peso molecular es de 29 kDa y la componen 265 aminoácidos. Asimismo, se ha reportado que se expresa en osteoblastos, pulmón, testículos, corazón, entre otros órganos menos

representados (Human Gene Database, 2018). Hay trabajos que han demostrado que M6b participa de la regulación de la función osteoblástica y formación ósea en un modelo de células madres mesenquimales humanas. Además, se ha postulado que estos efectos estarían asociados a la organización del citoesqueleto de actina (Drabek, y col., 2011). Otros estudios señalan que M6b tiene un rol central en la diferenciación, inducida por TGF- β , de células C3H10T1/2 a células del musculo liso. Además, se detectó a M6b, en tejidos embrionarios en desarrollo (E12.5), colocalizando con marcadores específicos del tejido muscular liso, en tejidos como la aorta y el esófago (Zhang, y col., 2018).

Se ha descrito, también, que M6b se encuentra involucrada con el transporte endocítico del receptor de serotonina (SERT). Particularmente, se ha demostrado en un modelo de sobreexpresión (HEK293-M6b-SERT) que M6b es capaz de modular el transporte endocítico del SERT. Esto podría modificar la concentración en superficie del receptor y de esta forma la recaptación de serotonina por parte de las neuronas (Fjorback, y col., 2009). En este sentido, la señalización alterada serotoninérgica ha sido asociada a desórdenes psiquiátricos (Murphy, y col., 2004). Más aún, se ha reportado una asociación significativa de un SNP (rs6528024) ubicado en un intrón del gen de *GPM6B* con un grupo de rasgos de comportamientos asociadas a trastornos psiquiátricos llamado DD (por *delay discounting*). Algunos de los rasgos característicos en personas con alto DD incluyen obesidad, adicción a drogas, déficit de atención o hiperactividad (Sanchez-Roige, y col., 2018). Estudios realizados en nuestro laboratorio han descrito que la expresión de M6b (mARN) disminuye en los hipocampos de ratones sometidos a estrés crónico (Fernandez, y col., 2010). De forma similar, se ha encontrado que pacientes con depresión diagnosticada, que terminaron en suicidio, tuvieron una disminución de la expresión de M6b en el hipocampo (Fuchsova, y col., 2015).

Por alineamiento de secuencias, se describió que M6b posee un alto porcentaje de identidad aminoacídica (56 %) con M6a. Existen distintos *splicing* alternativos del gen de M6b lo que da lugar a una variedad de proteínas distintas basadas en el mismo gen como se mencionó anteriormente. Al menos once variantes por *splicing* alternativo se generan a partir del gen de M6b tanto en ratones como en humanos (Werner, y col., 2001). Ésto les permite a las células generar distintas variantes que tendrán distinto tránsito intracelular y localización. A partir de evidencias experimentales, se ha sugerido que la expresión de las variantes generadas por *splicing* de M6b, al menos en parte, es célula específica. En este sentido, en ensayos de sobreexpresión con células MDCK se determinó que la presencia del dominio β , ubicado en el N-terminal, es necesario para que M6b se localice en la membrana plasmática y no en endomembranas. Sumado a esto, se encontró que, en oligodendrocitos, M6b no sólo se

encuentra en la membrana plasmática sino que también en endomembranas como ser en estructuras reticulares (Werner, y col., 2001, Werner, y col., 2013).

Si bien se han descrito mutaciones en *GPM6B*, como traslocaciones en el locus X22.2, como posibles causas del síndrome de Rett (OMIM 312750) (Ellison, y col., 1992, Olinsky, y col., 1996), estudios posteriores hechos en 55 pacientes determinaron que éstas no estaban implicadas en el desarrollo del síndrome (Narayanan, y col., 1998).

Estudios comportamentales y de fertilidad realizados en ratones *knock out* de *Gpm6b* (machos *Gpm6b*^{-Y} o hembras *Gpm6b*^{-/-}), tanto machos hemicigotas como hembras homocigotas, no mostraron alteraciones (Werner, y col., 2013, Mita, y col., 2015). Sin embargo, en ratones macho dobles *knock out* de *plp* y *Gpm6b* (*plp*^{-Y}, *Gpm6b*^{-Y}) se observó una severa hipomielinización y un marcado aumento en la neurodegeneración y muerte prematura (Werner, y col., 2013). Por su parte, el estudio de ratones doble mutantes de M6a y M6b (*Gpm6a*^{-/-}, *Gpm6b*^{-/-} o machos *Gpm6a*^{-/-}, *Gpm6b*^{-Y}) mostró un afinamiento o hipoplasia del cuerpo calloso, que no se correspondió con la disminución de la cantidad de neuronas. A su vez, el seguimiento de células individuales *in vivo* de ratones deficientes de M6a y M6b determinó que hubo fallas en el direccionamiento y crecimiento axonal de neuronas cuyos axones forman el cuerpo calloso. Sin embargo, no se han encontrado diferencias comportamentales ni de aprendizaje (Mita, y col., 2015). Con respecto a ensayos *in vitro*, se ha determinado que M6b induce la formación de protrusiones de membrana tipo filopodios en cultivos de neuronas hipocampales de rata y células COS-7, como lo hace M6a (Fernandez, y col., 2010). En esta misma línea, la sobreexpresión de M6b en oligodendrocitos generó un aumento de las protrusiones de membrana al igual que PLP (Werner, y col., 2013). También, en neuronas corticales provenientes de ratones deficientes de M6a y M6b, al complementarlas con M6b o DM20, se observó un incremento en la extensión de neuritas de forma similar al que se observa cuando se sobreexpresa M6a silvestre (Mita, y col., 2015). Por otro lado, se ha determinado en ratones que M6b participa desde los oligodendrocitos en la compactación de la mielina como lo hace PLP (Werner, y col., 2013).

La glicoproteína de membrana M6a.

M6a, en humanos, se encuentra codificada en el gen *GPM6A* ubicado en el cromosoma 4 en el locus 4q34.2 (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GPM6A>, (Human Gene Database, 2018)). Su expresión, en el SNC, principalmente es en las neuronas como ya se ha mencionado (Yan, y col., 1996). Se expresa en neuronas piramidales del hipocampo de las regiones CA1-4, el giro dentado, en el cerebelo y la corteza prefrontal (Alfonso, y col.,

2005b, Cooper, y col., 2008). M6a es una proteína que se encuentra en la membrana neuronal, en ratones y ratas, de neuronas de la zona marginal del tubo neural desde estadios embrionarios (E10). En ratones adultos, se observó su expresión en células granulares del cerebelo, células piramidales hipocámpales (CA1-4) y en la corteza prefrontal (Lagenaur, y col., 1992, Yan, y col., 1996). En este mismo sentido, se han realizado hibridaciones *in situ* en cerebros de rata adulta donde se observó a M6a también en dichas estructuras (Alfonso, y col., 2005a, Cooper, y col., 2008). Se ha determinado que M6a se expresa también en el plexo coroideo, la médula espinal, ganglios periféricos, tubos proximales renales, retina, células mieloides, entre otros tejidos menos representados (Lagenaur, y col., 1992, Human Gene Database, 2018). En cultivos primarios de neuronas de rata se observó que se localiza a lo largo de la membrana celular sin mostrar polarización (Alfonso, y col., 2005a, Formoso, y col., 2016). M6a, es una proteína de 278 aminoácidos y con un peso molecular de 35 kDa. Diversos reportes describieron los sitios de modificaciones postraduccionales que M6a posee. Algunas de estas modificaciones reportadas, tanto por predicciones bioinformáticas como por evidencias experimentales, son la N-glicosilación, palmitoilación, puentes disulfuro, fosforilación, ubiquitinación, miristoilación, entre otras (Fuchsova, y col., 2009, Brocco, y col., 2010, Goswami, y col., 2012, Formoso, y col., 2015a, Ito, y col., 2018, Rosas, y col., 2018).

Se ha documentado la vinculación de M6a y desórdenes neuropsiquiátricos en humanos (Boks, y col., 2008, Greenwood, y col., 2012, El-Kordi, y col., 2013, Gregor, y col., 2014, Ma, y col., 2018). Uno de ellos muestra que hubo correlación entre pacientes esquizofrénicos, con trastorno depresivo mayor, y un SNP (rs10520303) presente en la zona intrónica del gen de M6a (*GPM6A*) (Boks, y col., 2008). Otros reportes han establecido correlaciones entre otros SNPs, en regiones no codificantes del gen de *GPM6A*, con la depresión bipolar y la claustrofobia (Greenwood, y col., 2012, El-Kordi, y col., 2013). Por otro lado, un caso clínico reportó retardo mental, fallas en el aprendizaje y en el comportamiento de un niño que posee una duplicación del gen de *GPM6A*. Es decir, que el aumento de la dosis de M6a correlacionó con el retardo mental de un paciente pediátrico (Gregor, y col., 2014). Cabe destacar que, en el caso de PMD, el 60 % de los casos se generan por la duplicación del gen de *PLP1*, de forma similar al caso clínico reportado para la duplicación de *GPM6A* (Garbern, y col., 1999, Garbern, 2005, 2007, Werner, y col., 2013). Estudios bioinformáticos recientes mostraron a M6a como un gen que podría verse desregulado en la corteza prefrontal de pacientes con esquizofrenia. Sin embargo, no se observó una diferencia significativa en la abundancia del mRNA entre pacientes con esquizofrenia y pacientes control (Ma, y col., 2018). En nuestro laboratorio se evaluaron muestras post mórtem de individuos suicidas con depresión profunda y se determinó

que la expresión de *GPM6A* en el hipocampo se encontraba disminuida. En contraposición, en la corteza prefrontal la expresión de *GPM6A* no presentaba cambios (Fuchsova, y col., 2015). Éstos son algunos de los antecedentes que postulan a M6a como una proteína que tendría un rol en patogenia de los desórdenes psiquiátricos de origen multigénico. También se han descripto otras patologías en humanos donde M6a se encuentra involucrada, no relacionadas con el sistema nervioso central, como el cáncer colorrectal, falla cardíaca y diabetes tipo II (Camps, y col., 2009, Morrison, y col., 2010, Park, y col., 2013).

Con respecto al estudio de M6a en modelos animales hay numerosos reportes y en esta sección describiremos algunos de ellos. Estudios realizados con ratones *knock out* de M6a (*Gpm6a*^{-/-}) no mostraron diferencias en ensayos comportamentales con respecto a los controles. La fertilidad y la expectativa de vida han sido las esperadas. No obstante, animales *Gpm6a*^{-/-} desarrollaron un fenotipo claustrofóbico luego de ser sometidos a estrés experimental leve (El-Kordi, y col., 2013). Como se ha mencionado anteriormente, ratones doble mutantes *Gpm6a*^{-/-} y *Gpm6b*^{-/-} mostraron un afinamiento del cuerpo calloso o hipoplasia y fallas en el direccionamiento y crecimiento axonal. Sin embargo, no se han encontrado diferencias comportamentales ni de aprendizaje en estos animales (Mita, y col., 2015).

En nuestro laboratorio, utilizando el modelo experimental de la musaraña del árbol o *Tupaia belangeri*, sometidos al tratamiento con cortisol que produce un fenotipo simil estrés. A partir de los hipocampos del grupo simil estrés y del grupo control se realizó una biblioteca sustractiva y se seleccionaron 28 candidatos que estaban sub o sobre representados en el grupo tratado con cortisol (Alfonso, y col., 2004a). Para homologar estos resultados, se sometió a los animales a estrés psicosocial y se realizó posteriormente un estudio comparativo de expresión hipocampal (mARN). Se detectaron disminuciones en la expresión de *NGF* (*nerve growth factor*), *GPM6A*, *CLK-1* y *GNAQ* en machos del grupo estresado comparados con el control. Más aún, cuando se trató al grupo de animales estresados con un antidepresivo, como la clomipramina, se observó la restitución de la expresión de los genes indicados en el hipocampo a valores del control (Alfonso, y col., 2004b). Posteriormente, se realizó una comparación del modelo de *Tupaia belangeri*, tratados con cortisol, con ratones, estresados crónicamente, y se observó la disminución no sólo de los cuatro genes mencionados, sino que también de genes relacionados con la plasticidad neuronal, como *BDNF* y *CREB*, entre otros. Más aún, el tratamiento con el antidepresivo tianeptina restituyó los valores de mARN a niveles del control de todos los genes evaluados. Esto indica que la regulación de estos genes se mantiene entre especies, ante distintos modelos de estrés y frente a distintos tratamientos antidepresivos (Alfonso, y col., 2006). Otros estudios de nuestro laboratorio, con un modelo de ratas Wistar,

han demostrado que el estrés prenatal crónico, en la última semana de gestación, produce cambios en la expresión de *Gpm6a* de las crías. Los cambios se han registrado en el hipocampo donde hubo un aumento, y en la corteza prefrontal hubo una disminución de mARN de *Gpm6a*, a los 60 días del nacimiento de las crías macho. Estos cambios en la expresión fueron persistentes y están relacionados con modificaciones epigenéticas. Sumado a esto, se estudiaron los niveles de ciertos microARNs siendo el que disminuyó significativamente, en el hipocampo de los animales estresados, el microARN-133b. El microARN-133b demostró disminuir los niveles de M6a y bloquear la formación de filopodios *in vitro* en neuronas hipocampales de 7 DIV (días *in vitro*) (Monteleone, y col., 2014). Adicionalmente, en un modelo transgénico en ratones de la enfermedad de Alzheimer (EA) se ha reportado el aumento de la expresión de M6a en el bulbo olfatorio a los 3 meses y no así a los 6 meses de edad. Esto fue determinado haciendo una proteómica comparativa y se utilizó el bulbo olfatorio porque se deteriora tempranamente en este modelo animal de EA (Lachen-Montes, y col., 2016).

Otros modelos experimentales han sido utilizados para profundizar los estudios de M6a, como por ejemplo la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. Reportes de nuestro laboratorio indicaron que la mutante homocigota hipomórfica de M6, ortólogo a M6a, (presenta una disminución de la expresión de M6 de alrededor del 50 %, línea M⁰¹) no ha tenido defectos en ensayos de viabilidad, sino que, presentó esterilidad en las hembras. Estas mutantes hipomórficas se realizaron mediante la utilización de transposones y se generaron tres líneas. Una de ellas, M⁰¹, presentaba defectos en la fertilidad, otra, M⁰² fue fértil, y la última M⁰³ resultó letal. Acompañando estos fenotipos, se observó que la mutante M⁰¹ tenía disminuida la expresión de M6, mientras que M⁰² tenía niveles superiores al control, en tejido ovárico. Posteriormente, para corroborar si esta disminución de la expresión de M6 era la causa de la esterilidad en hembras, se generaron moscas *knock down* de M6 por la técnica de iARN inducibles, específicas del epitelio folicular ovárico, y se observaron resultados similares que para la mutante M⁰¹. De estos estudios se desprende que la reducción en la expresión M6 produjo el colapso de los huevos, sugiriendo que participa en la oogénesis de la mosca de la fruta (Zappia, y col., 2011). Más aún, se han reportado defectos en la respuesta a la luz a causa de un fenotipo defectuoso de la estructura de los ojos en adultos mutantes hipomórficos (M⁰¹) del gen M6. Esto se acompañó con la disminución significativa de la abundancia de mARN, medida en la cabeza de las moscas mutantes comparada con el control (Zappia, y col., 2012). Reportes de otros grupos han demostrado que las moscas mutantes que tienen interferido el gen de M6 de forma ubicua, han resultado en la muerte de las pupas. Además, se han descripto defectos en el tamaño de las alas con respecto a las moscas control. Cabe destacar que estos

efectos fueron más severos en machos comparados con las hembras (Gregor, y col., 2014).

Plasticidad neuronal.

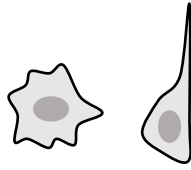
La plasticidad neuronal se refiere a la capacidad del sistema nervioso de cambiar su estructura anatómica y su función a lo largo de la vida de un individuo. Estos cambios se producen en reacción a la diversidad ambiental. En este sentido, se utiliza el término de plasticidad para referir a cambios a nivel molecular, celular, expresión génica y de comportamiento. Asimismo, la neuroplasticidad es la capacidad que tiene el cerebro de recuperarse y reestructurarse a sí mismo. Esto último, le permite recuperarse de desórdenes neuronales o injurias y, también, le permite reducir las alteraciones estructurales patológicas que provocan algunas enfermedades, como la esclerosis múltiple, la enfermedad de Parkinson, Alzheimer, entre otras (Kolb, y col., 2011).

Por su parte la plasticidad neuronal estructural se vincula a los cambios morfológicos que una neurona sufre a lo largo de su desarrollo normal o patológico. Estos cambios morfológicos pueden acompañarse de cambios funcionales que le permiten adaptarse a sus necesidades. Estudios realizados en neuronas de hipocampo de rata en cultivo, establecieron, que ocurren cambios morfológicos en pasos definidos. Estos pasos son una recapitulación de los eventos plásticos que ocurren durante el desarrollo del cerebro (Dotti, y col., 1988, Caceres, y col., 2012, Baj, y col., 2014), como son la neuritogénesis, formación de filopodios, *branching* o arborización dendrítica, formación y crecimiento axonal, formación y maduración de espinas. Además, la plasticidad neuronal le ofrece a la neurona compartimentalización bioquímica y eléctrica de funciones, las cuáles son requeridas para adaptarse a la complejidad de los circuitos cerebrales (Forrest, y col., 2018). Las neuronas provenientes de hipocampos de embriones de ratas en cultivo adquieren su polaridad característica luego de una serie de eventos de desarrollo estereotipado. Es decir, luego de 7 DIV una neurona hipocampal en cultivo tiene establecidos dos clases de procesos diferenciados: el axón y las dendritas. Éstos difieren no sólo en su morfología sino que también en su composición molecular y su polaridad sináptica. En esta polaridad neuronal se pueden distinguir tres fases, la formación de la primera neurita, la generación del axón y de dendritas a partir de neuritas, y la maduración de la polarización. En la primera fase se forman lamelipodios en las neuronas (1 DIV) recién sembradas, apolares esféricas, que luego de re arreglos del citoesqueleto y extensión de membranas dará lugar a la primera neurita. Posteriormente, ocurre la formación de neuronas bipolares, que dan paso a neuronas con múltiples neuritas primarias (1-2 DIV). En la segunda fase, uno de estos procesos se diferencia a axón y aparece el cono axonal (2-3 DIV). En la tercera fase, las neuritas maduran

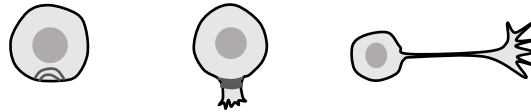
y se convierten en dendritas. Éstas generan ramificaciones y se complejiza el árbol dendrítico, y aparecen las estructuras filopodiales (3-4 DIV). A partir del 7 DIV comienzan a formarse estructuras de tipo espinas y se establecen las sinapsis. Luego de 12 DIV se adquiere la maduración de las dendritas aumentando el número de las espinas y la aparición de la actividad eléctrica espontánea. Una de las proteínas que caracterizan a las estructuras dendríticas es MAP-2 (*microtubule associated protein 2*) mientras que para los axones es Tau-1 (*microtubule associated protein tau*). Las espinas dendríticas y las dendritas que rodean al soma neuronal son los componentes post sinápticos mientras que los axones son pre sinápticos (Dotti, y col., 1988, Caceres, y col., 2012, Baj, y col., 2014). Estas fases se encuentran esquematizadas en la Figura 3.

Plasticidad neuronal asociada a M6a.

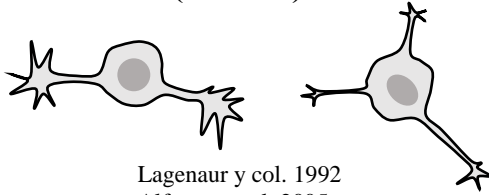
Un gran número de reportes sitúa a M6a como una proteína que participa positivamente en la diferenciación neuronal, extensión y aumento del número de neuritas, la formación de filopodios, sinaptogénesis y espinogénesis. En la Figura 3 se muestra un esquema de la diferenciación de neuronas de hipocampo *in vitro*, y las citas de los trabajos en los que se vinculan a M6a con cada uno de los estadios (Dotti, y col., 1988, Caceres, y col., 2012, Baj, y col., 2014, Ito, y col., 2018). Por su parte, Michibata y colaboradores han demostrado la participación de M6a en la diferenciación de células embrionarias a células precursoras neuronales. En un primer estudio han utilizado células derivadas de embrión de ratón comerciales, en las cuales han realizado la interferencia de *Gpm6a* con la utilización de shARN (*short hairping* ARN) y observaron una disminución significativa de la expresión del gen comparado con células control. Como consecuencia también se redujo la expresión de genes, asociados a la expresión neuroectodérmica, como *OTX1*, *Sox1* y *Wnt1* entre otros. Acompañando a estos hallazgos también encontraron una disminución de la cantidad de células embrionarias que se pudieron diferenciar a precursores neuronales (Michibata, y col., 2008). Un estudio similar fue realizado con células comerciales embrionarias de humano, sobreexpresando o suprimiendo a M6a mediante interferencia con shARN y evaluando a los genes asociados a la expresión neuroectodérmica (como ser: *OTX1*, *Sox2* y *Wnt1*). Encontraron un mayor número de células precursoras neuronales al sobreexpresar M6a en las células embrionarias. Como resultado, hubo una disminución de células precursoras neuronales cuándo se interfirió con el shARN a M6a en las células embrionarias. Por otro lado, han determinado

Diferenciación neuronal y migración

Michibata y col. 2008 y 2009

Fase I**Estadio 1: Formación de la primera neurita (1 DIV)**

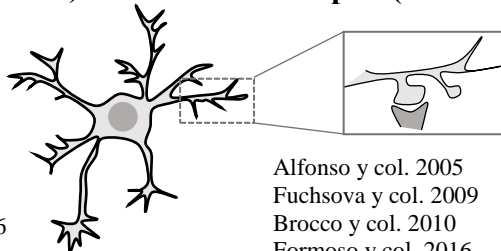
Honda y col. 2017

Fase II**Estadio 2: Formación y crecimiento de neuritas (1-2 DIV)**

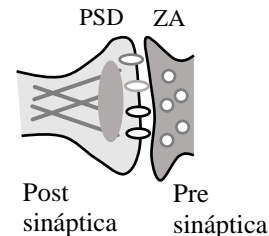
Lagenaur y col. 1992
Alfonso y col. 2005
Zhao y col. 2008
Sato y col. 2011
Formoso y col. 2015

Estadio 3: Especificación axonal (2-3 DIV)

Mita y col. 2015
Sato y col. 2011
Honda y col. 2017

Fase III**Estadio 4: Formación de filopodios (3-4 DIV)**

Brocco y col. 2010
Scorticati y col. 2011
Formoso y col. 2015
Álvarez Juliá y col. 2016
Rosas y col. 2018

Estadio 5: Establecimiento y maduración de sinapsis (7-15 DIV)

Alfonso y col. 2005
Fuchsova y col. 2009
Brocco y col. 2010
Formoso y col. 2016

Figura 3: Estadios de desarrollo de neuronas de hipocampo *in vitro* (Adaptado de Cáceres y col. 2012 y de Ito y col. 2017). La diferenciación neuronal y migración ocurre a estadios de desarrollo muy tempranos (Michibata y col. 2008 y 2009). Luego se muestran los estadios del desarrollo neuronal en cultivo dividido en tres fases. La Fase I muestra esquema de neuronas a 1 DIV donde se desarrollan lamelas y ocurre la formación de la primera neurita. La participación de M6a en la polarización neuronal se describe en el trabajo de Honda y col. 2017. En la Fase II son neuronas 1-2 DIV se desarrollan protrusiones primarias o neuritas primarias (ver trabajos de Lagenaur y col. 1992, Alfonso y col. 2005, Zhao y col. 2008, Sato y col. 2011 y Formoso y col. 2015). Además, neuronas de 2-3 DIV transforman una de sus neuritas en axón y se elonga formándose el cono axonal. Fase III, a los 3-4 DIV se complejiza el árbol dendrítico y se desarrollan los filopodios. El rol de M6a en este proceso se señala en los trabajos de Brocco y col. 2010, Scorticati y col. 2011, Formoso y col. 2015, Álvarez Juliá y col. 2016 y Rosas y col. 2018. Luego de los 7 DIV se desarrollan las espinas dendríticas y las conexiones sinápticas y a los 15 DIV maduran. Una sinapsis se compone de una zona post sináptica que tiene una zona densa post sináptica (PSD: *post synaptic density*) y receptores de membrana, como NMDA-Rs, y una espina pre sináptica que tiene vesículas en la zona activa (ZA) que contienen por ejemplo a sinaptofisina en la membrana y glutamato como neurotransmisor en su interior. El rol de M6a en esta etapa se describe en Alfonso y col. 2005, Fuchsova y col. 2009, Brocco y col. 2010 y Formoso y col. 2016.

que la sobreexpresión o la subexpresión de M6a en células embrionarias humanas generó un aumento o disminución, respectivamente, en la migración neuronal (Michibata, y col., 2009). Estos trabajos sugieren la participación de M6a en la maduración de células embrionarias a células precursoras neuronales. En este sentido, se ha reportado la participación positiva de M6a en un estudio de diferenciación celular en la línea PC12 en presencia de NGF (Mukobata, y col., 2002). En contraposición, en estudios realizados con cultivos de explantos de retinas murinas se ha reportado la participación de M6a en la extensión de neuritas pero no en la diferenciación ni en la proliferación de estas células (Zhao, y col., 2008).

En simultáneo Lagenaur y Baumrid y colaboradores, en sus esfuerzos por describir epítopes exclusivos de las membranas neuronales corticales, encontraron entre uno de ellos una proteína de membrana que era reconocida por un anticuerpo monoclonal que estaban desarrollando. Este reconocía a una proteína de membrana de aproximadamente 35 kDa y posteriormente fue denominada EMA (*edge membrane antigen*) por Baumrid y colaboradores, y M6a (por el nombre del pocillo) por Lagenaur y colaboradores (Baumrind, y col., 1992, Lagenaur, y col., 1992). Además de reconocer a M6a, también Lagenaur y colaboradores encontraron que, en su presencia, la extensión de neuritas en explantos de cerebelo se veía bloqueada. Luego, en cultivo de neuronas corticales, describieron también el bloqueo de la extensión de neuritas con el tratamiento. Sumado a que determinaron que este bloqueo era a causa de la interacción antígeno-anticuerpo específica, por lo que lo denominaron anticuerpo neutralizante (Lagenaur, y col., 1992). La participación de M6a en la formación y la extensión de neuritas en neuronas hipocámpales de 1-2 DIV fueron confirmadas mediante estudios de su sobreexpresión. Se determinó que la sobreexpresión de M6a aumentaba el número de neuritas en cultivo primario de neuronas de hipocampo y cerebelares de rata y en la línea N2a (Alfonso, y col., 2005a, Sato, y col., 2011b, Formoso, y col., 2015a, Mita, y col., 2015). Asimismo, se determinó que la sobreexpresión de M6a participaba en la extensión de neuritas de neuronas de hipocampo de rata y en líneas celulares como PC12 y N2a (Mukobata, y col., 2002, Sato, y col., 2011b, Formoso, y col., 2015a). Otros estudios de sobreexpresión de M6a, en células provenientes de la retina de ratones, demostraron su participación en la extensión de las neuritas como se ha mencionado (Zhao, y col., 2008). También, han descripto la importancia del estado de fosforilación en la serina 263, en el C-terminal del ortólogo de M6a, M6Ab de pez, en la extensión de neuritas en embriones de *zebrafish* (Huang, y col., 2011). Por otro lado, en un estudio previo de nuestro laboratorio se determinó la participación del estado de fosforilación en la tirosina en la posición 251 (Y251), que se localiza en el C-terminal, en la extensión de neuritas que más tarde se detallará (Formoso, y col., 2015a).

El desarrollo axonal, en cultivo, se puede determinar a partir del día 2-3 *in vitro* como se muestra en el esquema de la Figura 3. Se han realizado estudios de mutagénesis sitio dirigida que eliminaron la porción N-terminal de M6a y las neuronas que sobreexpresaron esta construcción extendieron neuritas de forma similar a M6a silvestre. Más aún, la exposición al anticuerpo neutralizante, de neuronas hipocampales de ratón que sobreexpresaban la mutante Δ N-terminal, no produjo el arresto de la extensión de neuritas ni del axón (Sato, y col., 2011a). Como se ha mencionado, en estudios de ratones *knock out* de M6a se ha descrito la disminución del largo del axón en cultivos primarios de neuronas de la corteza. Además, se reportó la disminución del tracto axonal en el cuerpo calloso en ratones dobles *knock out* de M6a y M6b (Mita, y col., 2015). Por su parte, Honda y colaboradores han observado que M6a participa de la polarización neuronal y el crecimiento axonal mediante su interacción con la proteína adaptadora Ruffy3 (*RUN and FYVE domain-containing3*) activa a Tiam2/STEF (*T-cell lymphoma invasion and metastasis 2*). Estos estudios los realizaron en neuronas corticales de ratón (Honda, y col., 2017b).

Se ha descrito, tanto en nuestro grupo como en otros, que M6a se encuentra parcialmente localizada en microdominios de membrana resistentes a detergentes o *lipid rafts* (Scorticati, y col., 2011, Honda, y col., 2017a, Ito, y col., 2018). Reportes recientes han demostrado que la localización de M6a en dominios tipo *lipid raft* estaría asociada a la señalización intracelular que determinaría la polaridad de neuronas corticales de ratón (Honda, y col., 2017a).

El aumento en la densidad de filopodios por unidad de neurita en neuronas de hipocampo de rata, y su motilidad, ha sido ampliamente descrito y estudiado mediante la sobreexpresión de M6a a 4-7 DIV (Alfonso, y col., 2005a, Fuchsova, y col., 2009, Brocco, y col., 2010, Scorticati, y col., 2011, Formoso, y col., 2015b, Alvarez Julia, y col., 2016, Rosas, y col., 2018). Además, hemos documentado que la partición de M6a en microdominios, *lipid raft*, es esencial para la formación de filopodios en neuronas de 5 DIV. Asociado a esto determinamos que las quinasas Src y MAPK son esenciales para la propagación de la señal asociada a la formación de filopodios mediada por M6a en neuronas y líneas celulares (Scorticati, y col., 2011). Por otro lado, la reducción de la expresión de M6a mediante la técnica de silenciamiento mediada por iARN específicos o microARN (mir-133b) mostraron una disminución en la formación de filopodios en neuronas de hipocampo de rata (Alfonso, y col., 2005a, Monteleone, y col., 2014, Alvarez Julia, y col., 2016). A partir de estudios realizados en líneas celulares, se ha demostrado que la sobreexpresión de M6a provoca el aumento de protrusiones de membrana como se ve en N2a, PC12, COS-7 y NIH/3T3 (Alfonso, y col., 2005a, Fuchsova, y col., 2009, Scorticati, y col., 2011). En este sentido, el tratamiento de células COS-7 con exosomas, provenientes de

neuronas de hipocampo de rata que sobreexpresaban M6a, indujo un aumento de protrusiones de membrana celular (Monteleone, y col., 2017). También se ha descrito la importancia del estado de fosforilación de la serina 263 de M6Ab, de *zebrafish*, en la formación de filopodios en células PC12 (Huang, y col., 2011).

La morfología y la composición molecular de las sinapsis proveen las bases estructurales de las funciones sinápticas (Harris and Weinberg, 2012). En este trabajo de tesis estudiamos las sinapsis glutamatérgicas de neuronas hipocámpales. Se ha reportado que M6a forma parte de vesículas sinápticas a partir de la purificación de sinaptosomas de cerebro de rata (Takamori, y col., 2006). Más aún, se ha documentado que M6a forma parte de vesículas pre sinápticas de axones glutamatérgicos del cerebelo y prosencéfalo de ratas adultas (Roussel, y col., 1998, Cooper, y col., 2008). Este tipo de sinapsis, la glutamatérgica, tiene características particulares en la composición de las proteínas que forman las estructuras pre y post sinápticas. El acoplamiento de estas dos estructuras anatómicas (mediada por proteínas) promueven la formación de la hendidura sináptica, favorecido por el contacto célula-célula y por ende la transmisión sináptica (Harris and Weinberg, 2012). El botón pre sináptico ubicado en el axón se compone mayormente de vesículas pre sinápticas que contienen neurotransmisores y moléculas de membrana como sinaptofisina, entre otras. Esta zona, con gran abundancia de vesículas sinápticas, se la denomina zona de actividad (ZA, Figura 3) que es dónde se generan las vesículas que están listas para ser liberadas hacia la hendidura sináptica ante los estímulos indicados (Cheung, y col., 2010, Kwon and Chapman, 2011, Adams, y col., 2015). La interacción sináptica, o hendidura, es una unión adhesiva especializada electrodena, cuando se la evalúa por microscopía electrónica. Por otro lado, las espinas dendríticas constituyen el componente post sináptico más estudiado y pueden diferir en su tamaño y composición. En la Figura 3 se puede observar que están compuestas por citoesqueleto de actina y proteínas de andamiaje lo que define una zona post sináptica densa (PSD). Proteínas características de esta zona son PSD-95, homero, shank, entre otras, que permiten la interacción con el citoesqueleto de actina. También se caracterizan por tener receptores de neurotransmisores en la membrana como los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA-Rs) que tienen alta afinidad por el glutamato. Estos receptores son heterotetraméricos y pueden estar compuestos por NR1, NR2A-D y NR3A-B (Lau and Zukin, 2007). Estudios de hibridación *in situ* en cerebros de ratón mostraron que la expresión de NR1 es ubicua en el cerebro. Particularmente los ratones *knock out* de NR1 en la región CA1 del hipocampo mostraron desarrollo normal pero con una LTP (*long term potentiation*) dañada que correlaciona fisiológicamente con dificultades en el aprendizaje y en la memoria espacial. Esto indica la importancia del receptor NMDA-R1 en la

fisiología hipocampal (Niciu, y col., 2012).

En nuestro laboratorio se describió que la densidad de filopodios/espinas aumenta en cultivos de neuronas de hipocampo de rata que sobreexpresaban M6a, como ya se mencionó. En este sentido, se acepta que en la maduración de las espinas dendríticas los filopodios podrían ser sus precursores (Brocco, y col., 2010). Además, al realizar la interferencia de M6a (iARN), se encontraron disminuciones significativas de la densidad de filopodios/espinas, por unidad de dendrita. Asimismo, en neuronas interferidas se observó la disminución de acúmulos de sinaptofisina (Alfonso, y col., 2005a). En este sentido, las formas mutadas de ciertas cisteínas en el EC2 de M6a produjeron una disminución en los clústeres de sinaptofisina en procesos MAP-2 negativos en neuronas del hipocampo (Fuchsova, y col., 2009).

En las hendiduras sinápticas es dónde la proximidad entre las proteínas pre y post sinápticas es mínima. Utilizando técnicas de inmunocitoquímica y microscopia confocal se pueden cuantificar las sinapsis como la colocalización entre los acúmulos de proteínas pre sinápticas (por ejemplo, sinapsina) y acúmulos de proteínas post sinápticas (como homero) a partir de las imágenes obtenidas analizadas con el *software* Image J (Ippolito and Eroglu, 2010). Nosotros en el laboratorio hicimos una adaptación de este protocolo para cuantificar sinapsis en cultivos maduros de neuronas de hipocampo de rata. Establecimos las sinapsis como la colocalización de acúmulos de sinaptofisina, como proteína pre sináptica y acúmulos de NMDA-R1, como proteína post sináptica. Además, hemos reportado que colocan acúmulos de M6a con acúmulos de sinaptofisina y con acúmulos de NMDA-R1 e incluso hay triples colocalizaciones. Por otro lado, la sobreexpresión de M6a produjo un aumento significativo de la densidad de espinas dendríticas, a expensas de espinas de tipo maduras, con extremos o cabezas voluminosos, y un aumento del número de sinapsis. Sin embargo, la presencia de nsSNPs ubicados en las regiones codificantes del TM2 de M6a, que se detallarán más adelante, inhibieron la espinogénesis y sinaptogénesis mediada por M6a (Formoso, y col., 2016).

Varios reportes han señalado la relevancia de la endocitosis de determinados componentes sinápticos, como medio de modulación de su actividad. Entre estos se encuentran sinaptofisina, NMDA-Rs (NR1, NR2A, NR2B), VAMP-2, entre otros (Fan, y col., 1998, Lau and Zukin, 2007, Cosker and Segal, 2014). El receptor de glutamato NMDA-R1 y R2A/B, está altamente regulado por el sistema endocítico. En su extremo C-terminal tiene motivos de tirosina que lo hacen susceptible a la endocitosis mediada por clatrina (EMC), que se explicará posteriormente (Lau and Zukin, 2007). Hasta el momento no se ha descrito un rol específico para sinaptofisina pero se conoce que es una proteína de cuatro pasos de transmembrana residente de las vesículas pre sinápticas. No obstante, es reconocida su participación en la cinética de formación/fusión

de vesículas sinápticas junto a VAMP-2 por la EMC en neuronas de hipocampo (Kwon and Chapman, 2011, Adams, y col., 2015). Este rasgo endocítico característico de ciertos componentes sinápticos de membrana podría ser en parte compartido por M6a.

Relación entre la estructura y la función de M6a.

Existen evidencias que destacan la importancia entre la estructura y la función de M6a y como ésto impacta en sus efectos plásticos. Como se ha descrito, M6a posee sitios predichos para modificaciones postraduccionales (Fuchsova, y col., 2009, Ito, y col., 2018, Rosas, y col., 2018). En su extremo N-terminal se han determinado residuos de cisteínas que podrían ser potencialmente sustratos de palmitoilación. Apoyando esto último se ha reportado, tanto en células COS-7 como en neuronas corticales, la presencia de palmitoilaciones de M6a que se encuentran en su extremo N-terminal (C17, 18 y 21) (Kang, y col., 2008, Honda, y col., 2017a). En un trabajo reciente se ha establecido, por mutagénesis sitio dirigida, que el reemplazo de las cisteínas 17, 18 y 21 por serinas, no afecta su ubicación en la membrana de neuronas corticales. Sin embargo, la ausencia de estos sitios de palmitoilación excluyeron a M6a de las fracciones correspondientes a DMR (por *detergent resistant membranes*) y de la colocalización con la proteína de unión al colesterol D4 (Honda, y col., 2017a). Estudios de nuestro laboratorio han demostrado que la asociación de M6a con *lipid rafts* es crítica para la formación de filopodios sumado a que, la propagación de la señal esta mediada por las Src y las MAPK quinasas. Tanto el tratamiento con inhibidores de las MAPK como de las Src produjeron la falla en la formación de filopodios en neuronas hipocámpales de rata que sobreexpresaban M6a (Scorticati, y col., 2011).

Los estudios de Sato y colaboradores sugieren que el extremo N-terminal de M6a estaría involucrado en el crecimiento axonal de neuronas del hipocampo de rata. Si bien al sobreexpresar una mutante de M6a, que carece del extremo N-terminal, se observó que la extensión de neuritas se mantenía, esta mutación impidió el bloqueo de la extensión de neuritas causado por el anticuerpo neutralizante (Sato, y col., 2011a). En neuronas corticales provenientes de animales mutantes *knock out* de *Gpm6a*^{-/-} y *Gpm6b*^{-/-} (machos) ó *Gpm6b*^{-/-} (hembras) en cultivo se ha descrito la falla en la extensión del axón y de neuritas. En el mismo modelo, cuando se hizo la complementación por transfección de M6a-GFP silvestre, se observó una extensión de neuritas significativamente mayor con respecto a aquellas transfectadas con GFP solamente. Además, cuando suplementaron a estas neuronas deficientes de M6a/M6b con M6a-Δ1-25 se observó la extensión de neuritas similar a M6a silvestre de igual forma a lo reportado por Sato y colaboradores (Sato, y col., 2011a, Mita, y col., 2015). Mientras que, el

N-terminal no parecería estar involucrado en la formación de filopodios, nuestro laboratorio ha descrito que la sobreexpresión de M6a que carecía del extremo N-terminal (*Gpm6a-ΔN*) indujo filopodios a niveles comparables a la forma silvestre de M6a en células N2a. Más aún, cuando se sobreexpresó *Gpm6a-ΔN* en neuronas de hipocampo de rata la inducción fue del 75 % comparada con el forma silvestre. Sin embargo, las diferencias entre M6a silvestre y truncada no fueron significativas (Rosas, y col., 2018).

Por otro lado, Fuchsova y colaboradores en el año 2009 describieron que cuatro cisteínas presentes en el EC2 (162, 174, 192 y 202) participan en la funcionalidad y localización celular de M6a. Se ha determinado que la C₁₇₄ y C₁₉₂ forman un puente disulfuro y la C₁₆₂ y C₂₀₂ son esenciales para su correcto plegamiento y localización, lo que le brindaría a M6a, una correcta topología. También se ha determinado que las cisteínas 174 y 192 son esenciales para la formación de filopodios, y para la abundancia de clústeres de sinaptofisina (Fuchsova, y col., 2009). En este mismo sentido, se ha descrito que el reconocimiento del EC2 por el anticuerpo neutralizante (Lagenaur, y col., 1992) necesita de la formación del puente disulfuro en los que las cisteínas descritas participan. En otras palabras, el correcto plegamiento del EC2 le brindaría a M6a propiedades estructurales, que se reflejan en su funcionalidad (Fuchsova, y col., 2009). Estudios de sobreexpresión de M6a truncada del bucle intracelular han determinado que no afectan la extensión de neuritas en neuronas hipocampales en cultivo provenientes de ratones *Gpm6a*^{-/-}. Sugiriendo que este dominio (Δ105-128) no estaría involucrado en la inhibición causada por el anticuerpo neutralizante (Sato, y col., 2011a). Sin embargo, estudios a posteriori realizados por Mita y colaboradores señalan que para la extensión de neuritas en neuronas corticales provenientes de ratones doble *knock out Gpm6a*^{-/-} y *Gpm6b*^{-/-} el bucle intracelular de M6a es esencial. Esto lo probaron suplementando a las neuronas con distintas versiones trucas del bucle intracelular (IC) de M6a (Δ105-128, Δ105-114 y Δ115-128) (Mita, y col., 2015).

En cuanto al extremo C-terminal de M6a, existe un amplio repertorio de trabajos que lo han estudiado. Nosotros hemos determinado la participación del estado de fosforilación de la tirosina 251 (Y251), del C-terminal de M6a, en la extensión de neuritas. Esto fue realizado mediante mutagénesis sitio dirigida reemplazando a la Y251D generando un sitio fosfomimético o bien por Y251A generando un sitio no fosforilable. Se observó que la Y251D es capaz de extender neuritas, aún en presencia del anticuerpo neutralizante tanto en células N2a como en neuronas de hipocampo de rata. Además, se determinó que la participación de la familia de las quinasas Src y de la vía de señalización de PI3K/Akt resultaron esenciales para la extensión de neuritas mediada por M6a silvestre y fosforilada (Formoso, y col., 2015a).

Por su parte, Sato y colaboradores han determinado que la sobreexpresión de M6a truncada, eliminando el C-terminal, no tiene efectos en la extensión de neuritas en neuronas de hipocampo de rata, ya que la expresión de la mutante respondió de forma similar al tratamiento neutralizante que las neuronas que sobreexpresaban M6a silvestre (Sato, y col., 2011a). En trabajos posteriores, Mita y colaboradores sobreexpresaron a M6a Δ C-terminal en neuronas corticales provenientes de ratones doble *knock out* *Gpm6a*^{-/-} *Gpm6b*^{-/-} y obtuvieron extensiones de neuritas similares a M6a silvestre (Mita, y col., 2015). En nuestro laboratorio, el estudio de M6a- Δ C-terminal (Δ 243-278) determinó que inhibe la formación de filopodios significativamente tanto en células N2a como en neuronas de hipocampo de rata. Asimismo, estudios de *alanine scanning* han determinado el rol de los siguientes aminoácidos: K250, D253/K255, E258/E259 y la E258 en la formación de filopodios tanto en células N2a como en neuronas de hipocampo de rata en cultivo (Rosas, y col., 2018). Por otro lado, hallazgos de nuestro laboratorio, dónde se ha realizado una inmunoprecipitación con un anticuerpo policlonal que reconocía al C-terminal de M6a, se encontraron proteínas que interaccionan directa o indirectamente con M6a. El material biológico de partida fue un homogenato de hipocampo de rata. A partir de estos estudios se determinó que M6a interaccionó con la cadena pesada de clatrina, con coronina 1a, Camk2a, entre otras (Fuchsova, y col., 2015). A su vez, cuando se realizó la inmunoprecipitación de coronina, a partir de homogenatos de hipocampo de rata, con anti-coronina1a se detectó a M6a y a la proteína Rac1 (Alvarez Julia, y col., 2016). En estudios de sitios putativos de fosforilación, ubicados en los extremos citoplasmáticos de M6a T10, S256, S267 y T268, se observó que participan en la motilidad de los filopodios. Es decir, la mutante múltiple, que reemplaza los 4 sitios putativos, mostró menor movilidad de filopodios comparados con M6a silvestre (Brocco, y col., 2010).

Estudios recientes de nuestro laboratorio demostraron que M6a se encuentra en distintos grados de oligomerización en las membranas neuronales de hipocampo de rata. En particular, se ha determinado que parte de esta interacción reside en sus dominios de TM. Se ha determinado que ciertas glicinas presentes en los TM2 y TM4 son las que participan en las interacciones homotípicas entre los TM. Ésto fue determinado mediante ensayos de TOXCAT en bacterias y de *crosslinking*, a partir de neuronas de hipocampo y células N2a transfectadas con las mutantes de glicinas (G87/96/103A y G220/222/A). Estos estudios mostraron la pérdida parcial de oligomerización de las mutantes de glicinas. De modo similar se ha descripto la presencia de tres variantes génicas (nsSNPs) de M6a posicionadas en su TM2 (SNP1 y SNP2) y su TM3 (SNP3). Se descartó a la variante SNP3 (rs11545193, W141R) de los ensayos funcionales ya que queda retenida en el retículo endoplásmico (RE). Al expresar las variantes

SNP1 (rs11545190, F93C) y SNP2 (rs11729990, I97S) determinamos que provocan la reducción parcial de oligomerización en las membranas de células N2a. A su vez, en ensayos funcionales tanto las mutantes de glicinas como las variantes génicas mostraron una disminución en la formación de filopodios, por unidad de neurita, en cultivos de neuronas de hipocampo de rata (Formoso, y col., 2015b).

Recientemente en nuestro laboratorio hemos demostrado que M6a forma parte de las sinapsis establecidas en neuronas de hipocampo de rata. En este sentido, como ya se mencionó, encontramos que M6a colocaliza tanto con la proteína pre sináptica sinaptofisina como con el receptor post sináptico NMDA-R1. Sumado a esto, describimos que la sobreexpresión de M6a en neuronas maduras (15 DIV) induce un aumento significativo tanto de los clústeres de sinaptofisina como los de NMDA-R1 y del número de sinapsis por unidad de dendrita. Asimismo, describimos que la sobreexpresión de M6a produjo un aumento significativo del número de espinas por unidad de dendrita. Profundizando los estudios de los efectos de las variantes génicas, determinamos que la presencia del SNP1 ó del SNP2 afectan negativamente la espinogénesis y sinaptogénesis mediada por M6a en neuronas de hipocampo (Formoso, y col., 2016). Estos resultados sugieren la participación positiva de M6a en la formación y mantenimiento de las sinapsis en cultivos de neuronas de hipocampo.

En resumen, las evidencias hasta aquí expuestas dan cuenta del rol de M6a en la plasticidad neuronal. En los últimos años, otros laboratorios y nosotros hemos avanzado en determinar cuáles son los dominios ó aminoácidos claves para que M6a produzca su acción plástica en cultivos primarios de neuronas y distintas líneas celulares neuronales y no neuronales. Sin embargo, aún hay interrogantes por dilucidar acerca del mecanismo completo de acción así de cómo participa en la plasticidad neuronal. En este presente trabajo de tesis se pretende contestar algunos de ellos.

M6a y las tetraspaninas.

La familia de las PLPs posee semejanza estructural con las tetraspaninas (TTs). (Fuchsova, y col., 2009, Scorticati, y col., 2011). La familia de las TTs involucra a un extenso grupo de glicoproteínas de membrana con identidad de secuencia baja pero poseen tanto la estructura secundaria como la terciaria conservada. Se sabe que estas últimas forman una red de proteínas organizadas en microdominios de membrana plasmática (TEM: *tetraspanin enriched domain*) y que dicho orden se establece mediante las interacciones proteína-proteína y proteína-lípido. Las asociaciones laterales entre sí o con otras proteínas es un rasgo distintivo y juega un rol crucial en la ejecución de sus funciones (Levy and Shoham, 2005). Se ha

reportado que la especificidad funcional estaría comandada por su dominio EC2 (Rajesh, y col., 2012). Además, es un antígeno inmunodominante ya que se han reportado epítopes inmunogénicos en este dominio (Kovalenko, y col., 2007). Numerosos reportes han dado cuenta del desarrollo de anticuerpos monoclonales y moléculas que interactúan con el EC2 de las TTs para modular su función (Hemler, 2008, Hassuna, y col., 2009). Con respecto a M6a, hasta la fecha no se han determinado ligandos endógenos aunque se conocen evidencias bibliográficas que sugieren que la función de M6a estaría comandada por señales que recibe a través de su EC2 de forma análoga a lo que ocurre con las TTs. Es el caso del anticuerpo monoclonal neutralizante el cual reconoce al EC2 de M6a (anti-M6a-mAb) y es capaz de bloquear la extensión de neuritas en cultivo de neuronas cerebelares e hipocampales (Lagenaur, y col., 1992, Formoso, y col., 2015a). Sumado a esto, la mutante de cisteínas del EC2 de M6a, que elimina el puente disulfuro y por tanto su topología, sobreexpresada en neuronas hipocampales de rata, no es reconocida por este anticuerpo. Asimismo, esta mutante inhibe la formación de filopodios y los clústeres de sinaptofisina comparada con M6a silvestre (Fuchsova, y col., 2009). Como hemos descripto M6a forma parte de los *lipid rafts* (Scorticati, y col., 2011) lo que propicia la interacción consigo misma (Formoso, y col., 2015b) y con proteínas residentes (por ejemplo Src, (Formoso, y col., 2015a)), sugiriendo que las asociaciones homo-heterotípicas laterales ayudan a estabilizar/potenciar las señales que recibe a través del EC2. Como las TTs, creemos que las asociaciones que M6a establece dentro de los microdominios de membrana plasmática (consigo misma, otras proteínas y con lípidos), ya sean del tipo *lipid rafts* o TEMs, le sirven de plataforma para iniciar la señalización intracelular que conlleva a la plasticidad neuronal (Formoso, y col., 2015b, Homsi and Lang, 2017, Honda, y col., 2017a, van Deventer, y col., 2017, Ito, y col., 2018). Sin embargo, hasta la fecha no se conoce completamente la relación entre la estructura y la función de M6a, es por eso que tampoco se conocen completamente los mecanismos de acción asociados a su función plástica, así como tampoco se conocen moduladores endógenos.

Red endocítica.

La endocitosis es el término general utilizado para describir la internalización de solutos, fluidos, macromoléculas, componentes de la membrana plasmática y partículas en células eucariotas. En particular este proceso ocurre mediante la invaginación de la membrana plasmática formando vesículas endocíticas. En una célula de mamífero típica, alrededor del 50-180 % de la superficie celular es recambiada por endocitosis y reciclado de membranas cada hora. Podríamos decir que el sistema endocítico y de reciclado son mecanismos que le permiten

a una célula estar en equilibrio entre las necesidades celulares y el medio ambiente que la rodea. Sumado a esto, la dinámica espacio-temporal de dónde y cómo se dan los mecanismos endocíticos y de reciclado es fundamental para la supervivencia y correcto funcionamiento celular. Por otro lado, la internalización de moléculas de superficie y su re-direccionamiento hacia distintas organelas es crucial para la apropiada fisiología de la célula (Huotari and Helenius, 2011, Neefjes, y col., 2017).

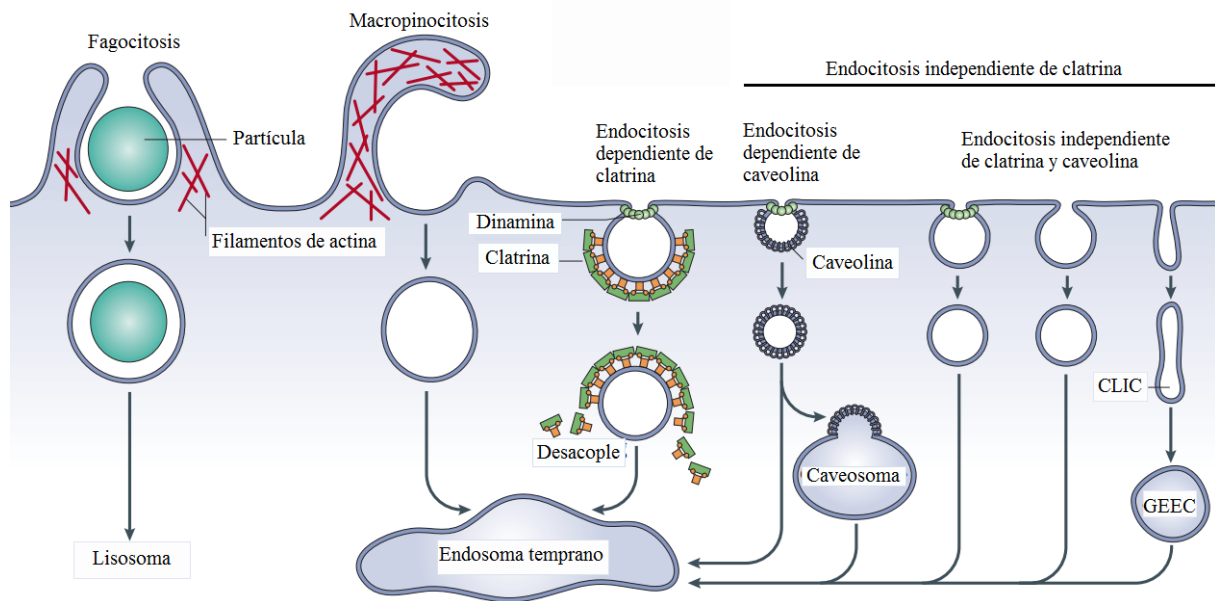


Figura 4: *Vías endocíticas de células eucariotas*. La fagocitosis internaliza partículas voluminosas a la célula mientras que la macropinocitosis internaliza fluidos. Ambos procesos dependen de la polimerización de actina. Tanto la endocitosis dependiente de clatrina (EMC) como de caveolina (EIC) también son dependientes de dinamina. En los primeros los endosomas están revestidos de clatrina mientras que en los segundos están revestidos de caveolina. Luego están las vías endocíticas independientes de clatrina y caveolina que dan lugar a endosomas tempranos enriquecidos en GPI (GPI-anchored protein enriched early endosomal compartments: *GEEC*). Dentro de estos también está la *bulk* endocitosis (Adaptado de Mayor and Pagano y col. 2007).

También la endocitosis y reciclado están asociados al mantenimiento de la regulación homeostática de moléculas en determinado compartimento celular. Un ejemplo de esto es la interacción de un receptor con su ligando. Cuando un receptor recibe señales a través de un ligando se despliega la propagación de la señalización río abajo. Una vez recibido el estímulo, la célula puede redirigir más receptores hacia la membrana plasmática (*upregulation*) o bien internalizar al receptor para eliminar el estímulo (*downregulation*). Tanto en un caso como en el otro es necesaria la participación de la red endocítica y de reciclado. En células eucariotas existen numerosas vías para la endocitosis de moléculas de la superficie celular, y su reciclado (Maxfield and McGraw, 2004). Mientras que algunas moléculas se internalizan por el mecanismo clásico de endocitosis mediada por clatrina (EMC), existen diversos mecanismos

que no utilizan clatrina. La endocitosis independiente de clatrina (EIC) está conformada por distintos tipos de internalización en donde los más característicos son los mediados por caveolina y la *bulk* endocitosis entre otros (Mayor and Pagano, 2007). En la Figura 4 se pueden observar las principales vías endocíticas eucariotas.

Endocitosis neuronal.

La red endocítica es fundamental al momento de establecer la arquitectura y funcionalidad de una célula eucariota (Neefjes, y col., 2017). Especialmente en neuronas, la endocitosis de factores de crecimiento, receptores de neurotransmisores y proteínas de andamiaje regulan dónde y de qué manera se inicia y propaga la señalización intracelular. Como resultado, las vías de endocitosis y reciclado de proteínas de superficie en neuronas son críticas en diferentes aspectos. Algunos de los más relevantes son la supervivencia neuronal, el crecimiento y direccionamiento axonal, bifurcación dendrítica, formación y mantenimiento de sinapsis y la migración celular (Farias, y col., 2012, Cosker and Segal, 2014, Cousin, 2015, Britt, y col., 2016).

Las redes endocíticas le permiten a las neuronas internalizar, reciclar, degradar y excretar de manera selectiva moléculas de membrana. De esta manera las neuronas coordinan y controlan los eventos y estímulos, en tiempo y espacio (Neefjes, y col., 2017). En lo que respecta a la diferenciación axonal, se reportó que la internalización de ligando-receptor que involucra a BDNF y su receptor (TrkB) es crucial. Cabe destacar que el BDNF puede estimular a otro tipo de receptores y a su vez el TrkB puede ser estimulado por más de una neurotrofina. Su señalización, diferencial desde los endosomas, se amplifica generando una autorregulación y potenciación de la señal. Esta autorregulación y potenciación genera la diferenciación de una neurita hacia un axón. Una vez diferenciado el axón se reclutan factores específicos, como ankirina 2 (Ank-2), que le dan propiedades particulares a la base axonal. Esta zona pre-axonal de exclusión de vesículas endocíticas (PAEZ por sus siglas en inglés) es la encargada de restringir o permitir el paso de ciertas vesículas de forma específica siendo una de las formas por las cuáles una neurona regula la endocitosis y transporte de endosomas (Kwon and Chapman, 2011, Cosker and Segal, 2014, Britt, y col., 2016).

La señalización a través de la endocitosis de las neurotrofinas es la que promueve, por un lado cambios morfológicos en cuanto a la bifurcación dendrítica, y por otro, la supervivencia neuronal en neuronas de hipocampo de rata. Asimismo, la endocitosis del receptor TrkB causada por su ligando BDNF tiene efectos diversos. Cuando TrkB se acumula en endosomas de reciclado tipo Rab11 genera un aumento de la concentración local del receptor. Esta

concentración de TrkB, favorecida por la acción de BDNF, promueve la arborización dendrítica (Lazo, y col., 2013). En cuanto a la plasticidad dendrítica, la privación de BDNF, con un anticuerpo neutralizante, en neuronas hipocampales mostró una disminución en espinas dendríticas tanto en densidad como en la disminución del citoesqueleto de actina. Esto sugiere que el BDNF es necesario para el mantenimiento de las espinas y el tamaño de su cabeza en neuronas de hipocampo de rata maduras (Merrifield and Kaksonen, 2014).

En cuanto a la participación del sistema endocítico en la transmisión sináptica neuronal, hay evidencia de que los potenciales de acción pueden desencadenar la fusión rápida de las vesículas sinápticas listas para su liberación (RRP: *readily releasable pool*), liberando su contenido a la hendidura sináptica. Para compensar la pérdida de membrana plasmática y la saturación del sistema clásico de EMC, se hace presente la *bulk* endocitosis. Estímulos eléctricos moderados favorecen la participación de la vía EMC mientras que estímulos fuertes favorecen la *bulk* endocitosis/exocitosis para la formación/liberación de las vesículas sinápticas (Cheung, y col., 2010, Cousin, 2015). Particularmente la *bulk* endocitosis involucra grandes regiones de la membrana neuronal y es una invaginación rápida. Este tipo de endocitosis puede responder a actividad neuronal eléctrica (ADBE: *activity-dependent bulk endocytosis*) (Cheung, y col., 2010). De forma clásica en las terminales sinápticas se forman endosomas de tipo *bulk* que se generan por la EIC. En la formación de este tipo de endosomas participa el citoesqueleto de actina, la miosina y la dinamina. Una vez formado este endosoma voluminoso se generan, a partir de éste, vesículas sinápticas denominadas de reserva. Cabe destacar que en la generación de las vesículas de reserva, a partir del endosoma voluminoso, participa AP-1, AP-3 y clatrina. Estas vesículas sinápticas de reserva, ante un estímulo recibido, se convierten en RRP y quedan listas para ser liberadas cuando se necesite (Cousin, 2015).

Con respecto a la endocitosis de los componentes neuronales que participan en la sinapsis, tal es el caso del receptor de glutamato, NMDA-R1, que forma parte de la post sinapsis, está altamente regulado por el sistema endocítico. Este receptor se acopla a la zona densa post sináptica (PSD, *post synaptic density*) y es ahí donde forma parte de la transmisión sináptica. Este receptor es uno de los que son capaces de unirse al glutamato y, dependiendo de los estímulos que reciba, se comporta como canal iónico. Su actividad está estrechamente relacionada con las subunidades que lo compongan y su tráfico en las espinas dendríticas post sinápticas. Es por ello que en su extremo C-terminal tiene motivos de tirosina que lo hacen susceptible a la EMC previa a su difusión lateral desde la hendidura sináptica hacia el cuello de la espina. La modulación de sus funciones es altamente dependientes de su localización ya sea en la membrana o en vesículas de la red endocítica (Lau and Zukin, 2007). Los motivos de

tirosina se detallarán más adelante. Otro de los componentes sinápticos que también forma parte del sistema endocítico ampliamente estudiados es sinaptofisina que forma parte de las membranas de las vesículas sinápticas que contienen a los neurotransmisores. Hasta el momento no se ha descrito un rol específico para sinaptofisina pero se conoce que es una proteína de cuatro pasos de transmembrana residente de las vesículas pre sinápticas. Sin embargo, es reconocida su participación en la cinética de formación/fusión de vesículas sinápticas junto a VAMP-2 por la EMC de neuronas de hipocampo (Kwon and Chapman, 2011, Adams, y col., 2015).

Endocitosis mediada por clatrina.

La EMC es un proceso que involucra múltiples pasos: la formación, nucleación, estabilización y maduración de los endosomas generados desde la membrana plasmática. Estos pasos darán lugar a vesículas revestidas de clatrina las cuales podrán contener receptores de membrana y otras proteínas. En los pasos de iniciación están involucrados los de la invaginación de la membrana en donde la nucleación de factores específicos es requerida para la estabilización y maduración de los endosomas. En los pasos de maduración se involucran diferentes factores adaptadores y efectores. Este paso es seguido de la escisión de la vesícula, comandada por la GTPasa dinamina, la cual con gasto de GTP produce el estrangulamiento de la membrana y liberación del endosoma hacia el citoplasma (Merrifield and Kaksonen, 2014, Cousin, 2015). Cabe recordar que se ha descrito que la cadena pesada de clatrina coimmunoprecipita con M6a, como se expuso en secciones anteriores. Esto fue determinado por inmunoprecipitación de M6a (anti-M6a C-terminal) a partir de homogenatos de hipocampo de rata seguido separación de las proteínas por SDS-PAGE e identificación de las bandas por espectrometría de masas (Fuchsova, y col., 2015).

Asociado a la EMC se encuentran las proteínas accesorias y adaptadoras como lo es la proteína adaptadora 2 (AP-2) que es reclutada, desde el citoplasma, a la cara interna de la membrana plasmática y asiste a la EMC. La proteína AP-2 participa de la nucleación ya que es capaz de interactuar con componentes de la membrana plasmática, como PIP₂, la molécula a endocitar y el trisquelion de clatrina. AP-2 está conformada por 4 subunidades distintas α -2, β -2, σ -2 y μ -2. Es el caso de μ -2 que interacciona con motivos basados en tirosina y σ -2 interacciona con motivos basados en dileucina cómo se explicará más adelante. Una vez que AP-2 participa de la formación de la vesícula tanto clatrina como AP-2 se desacoplan y se reciclan al citoplasma para los subsiguientes ciclos de endocitosis (Merrifield and Kaksonen, 2014, Kadlecova, y col., 2017).

Uno de los factores primordiales del reclutamiento de proteínas adaptadoras y accesorias determinantes para la internalización son los motivos aminoacídicos presentes en los extremos citoplasmáticos de las proteínas diana (Bonifacino and Dell'Angelica, 1999). AP-2 al ser activada por fosforilación participa de la nucleación y maduración de los endosomas. Las subunidades α -2 y β -2, que la conforman, son voluminosas y poseen dos dominios bien definidos. Uno tiene sitios de unión para las subunidades pequeñas σ -2 y μ -2. El otro dominio es móvil y se ensambla tanto con PIP₂, para anclarse a la membrana plasmática, como con las cadenas en forma de trisquelion de clatrina (Bonifacino and Dell'Angelica, 1999, Merrifield and Kaksonen, 2014, Adams, y col., 2015). La secuencia aminoacídica consenso YXX Φ es uno de los motivos basados en tirosina. En estos motivos los aminoácidos centrales (X) pueden ser cualesquiera y el aminoácido Φ debe ser un aminoácido con cadena lateral hidrofóbica o un grupo voluminoso. Cuando esta secuencia está presente en los extremos citoplasmáticos de las proteínas diana pueden ser reconocidas por las subunidad μ -2 de AP-2. Otro de los motivos consenso es el (FY)XNP(YF) (Escudero, y col., 2014, Liu, y col., 2014). Por otro lado σ -2 es capaz de reconocer motivos de tipo “dileucina” que tienen la secuencia consenso (D/E)XXXL(L/I) (Pandey, 2009, Cosker and Segal, 2014, Robinson, 2015).

Es el caso de diferentes receptores, como el receptor de transferrina (Tf-R), que son constitutivamente internalizados por la vía de EMC luego del estímulo de su ligando. Esta endocitosis está asociada a la unión de AP-2 con un motivo de tirosina en su extremo N-terminal citoplasmático (²⁰YTRF²³). Una vez generadas estas vesículas pueden formar parte de endosomas tempranos y luego son capaces de ser recicladas hacia la membrana plasmática (tanto por la vía lenta, cómo por la vía rápida) o ser enviadas a degradación (Hueffer, y col., 2004, McMahon and Boucrot, 2011). La vía endocítica y el destino celular de la transferrina (Tf) están muy bien caracterizados en reportes bibliográficos. Tanto por estudios bioquímicos como de microscopía confocal (Harding, y col., 1983, Iacopetta and Morgan, 1983, Sonnichsen, y col., 2000, Keil and Hatzfeld, 2014). Otro, es el caso de la TT CD63 que posee un motivo basado en tirosina en su extremo C-terminal (YEVM). Este motivo sería capaz de interactuar con AP-2 y AP-3 por la EMC. CD63 interacciona y endocita a la subunidad β de la H, K-ATPasa (H, K- β) y la dirige hacia los compartimentos endocíticos adecuados ya sea a reciclado o a degradación en el lisosoma (Duffield, y col., 2003).

Diversos reportes han documentado la utilización de inhibidores farmacológicos para la vía EMC. En la Figura 5 se puede observar un esquema de la EMC y dos de sus posibles inhibidores, la metil- β -ciclodextrina (MCD) y la monensina. La MCD es un compuesto cíclico formado por oligómeros de glucosa capaz de secuestrar colesterol. Ha sido demostrado que este

secuestro produce la inhibición de la formación de endosomas revestidos de clatrina (Ceresa, y col., 1998, Rodal, y col., 1999, Kirkham and Parton, 2005). Por su parte la monensina es un compuesto ionóforo que, mediante la disipación del gradiente de protones, inhibe la endocitosis dependiente de clatrina (Chen, y col., 2009).

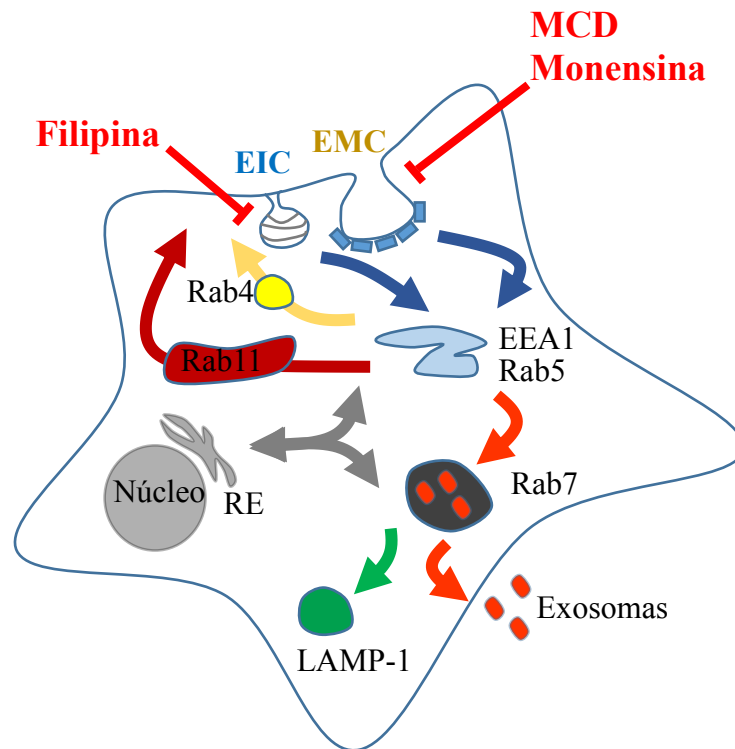


Figura 5: *Destino celular de una proteína endocitada.* Inhibidores de la EMC: metil- β -ciclodextrina (MCD), monensina. Inhibidores de la EIC: filipina. Endosomas tempranos característicos por ser Rab5/EEA1 positivos. Los endosomas tempranos pueden dar lugar al reciclado lento vía endosomas Rab11 positivos o reciclado rápido vía endosomas Rab4 positivos. Por otro lado pueden evolucionar hacia endosomas tardíos Rab7 positivos. Estos últimos pueden dar lugar a los exosomas o bien evolucionar hacia endosomas de tipo degradativos LAMP-1 positivos. Además, puede haber una progresión retrograda y anterógrada de los endosomas hacia el retículo endoplásmico (RE).

Endocitosis independiente de clatrina.

La endocitosis independiente de clatrina (EIC) está conformada por diversas vías siendo una de las más descriptas la endocitosis mediada por caveolina/*rafts*. Esta vía se caracteriza por internalizar moléculas presentes en microdominios de membrana que están altamente organizados. Esta organización está comandada por proteínas integrales de membrana, como TTs, flotilina, lípidos, colesterol, esfingolípidos y gangliosidos especialmente. Se ha reportado la presencia de moléculas de señalización en la cara citoplasmática de estos microdominios. Hasta el momento, no hay registros de cuáles son las proteínas adaptadoras que participan en la formación de este tipo de endosomas revestidos de caveolina. Una vez generado, se lo denomina caveosoma hasta que se produce el desacople del recubrimiento de caveolina

(Kirkham and Parton, 2005, Mayor and Pagano, 2007).

Por otro lado, forma parte de esta clasificación la *bulk* endocitosis en la que no participa ni clatrina ni caveolina como revestimiento, como ya se mencionó (Lau and Zukin, 2007). Este tipo de endocitosis es frecuente en las dendritas y axones de las neuronas ya que de esta forma se acumulan neurotransmisores en las espinas hasta que sean requeridos en las hendiduras sinápticas. La formación de este tipo de endosomas es dependiente de la potencia del estímulo que reciba la neurona. Es decir, un estímulo fuerte produce la ADBE que se explicó anteriormente (Cheung, y col., 2010). Su formación depende fuertemente de la generación de un anillo de actina coordinado con miosina II y dinamina, que le facilitan la escisión de la membrana para su endocitosis (Meunier and Gutierrez, 2016). En bibliografía se ha reportado que células corticales de rata expuestas a colorantes fluorescentes, que se endocitan por EMC o *bulk* endocitosis selectivamente, fueron sometidas a distintos potenciales de acción. Esto último le permite a las células corticales acumular a los colorantes en vesículas citosólicas, las vesículas generadas por EMC tienen un colorante y las generadas por *bulk* tienen el otro. Las vesículas sinápticas que fueron generadas por EMC fueron extinguidas luego de 20 segundos de un potencial de acción continuo. Sin embargo, las vesículas endocíticas fluorescentes que provienen de la *bulk* endocitosis siguen generándose aún después de un estímulo fuerte continuo. Esto sugiere que la ABDE provee de nuevas vesículas sinápticas al pool de reciclado y le permitiría a las terminales nerviosas seguir liberando neurotransmisores durante períodos de estimulación prolongados y/o más fuertes (Cheung, y col., 2010).

Diversos trabajos han reportado la utilización de filipina, toxina antibiótica capaz de secuestrar colesterol de las membranas plasmáticas, como inhibidor de la EIC. En la Figura 5 se puede ver ejemplificada la EIC y la presencia del inhibidor filipina (Wu, y col., 2007, Winterstein, y col., 2008).

Vías endocíticas y de reciclado.

Independientemente de cuál haya sido la vía por la que fueron internalizadas las moléculas a la red endocítica, éstas pueden compartir destinos celulares. Es decir, una molécula endocitada por la vía de caveolina o de clatrina pueden encontrarse en endosomas de tipo tempranos. Estos se caracterizan por contener a Rab5 y a su efector EEA-1 (*Early Endosomal Antigen 1*) en sus membranas (Simonsen, y col., 1998, Christoforidis, y col., 1999) (Figura 5). Las proteínas Rabs son una familia de pequeñas GTPasas asociadas a Ras (p21), las cuales controlan la progresión de la endocitosis, con gasto de energía y la fusión de membranas. Son capaces de hidrolizar GTP a GDP y utilizar esa energía para coordinar los eventos endosomales. En particular,

controlan el reconocimiento inicial de los endosomas y el anclaje a los diferentes componentes endocíticos de la red. La maduración y transporte en parte depende de la asociación y disociación de las Rabs de forma ordenada y secuencial y de la participación de moléculas efectoras como PI3K o moléculas motoras como quinesina y dineína. También, las Rabs, son las responsables de coordinar de manera específica el acople de las moléculas motoras orquestando el transporte, fusión y la fisión generando la conectividad en la red endocítica. Es decir, las diferentes Rabs, junto con el citoesqueleto, son capaces de controlar el tráfico, y potencialmente controlar la respuesta biológica celular tanto en tiempo como en espacio (Huotari and Helenius, 2011, Neefjes, y col., 2017).

Los endosomas tempranos son reconocidos como los principales centros clasificadores dentro de la red endocítica de una célula. Parte de este conjunto de endosomas puede evolucionar hacia endosomas tardíos, característicos por reemplazar a Rab5 por Rab7 en sus membranas. Se acepta que, en la transición, existen endosomas híbridos Rab5/Rab7 positivos. Estos a su vez pueden madurar hacia endosomas de tipo degradativos como los lisosomas característicos por tener a LAMP-1 en sus membranas. Por su parte, los endosomas tardíos (Rab7 positivos) son típicamente más voluminosos que los tempranos y cuándo maduran lo hacen por fusión con endosomas ácidos generalmente de tipo LAMP-1 positivos (Mayor and Pagano, 2007, Neefjes, y col., 2017). Los endosomas de tipo degradativos, LAMP-1 positivos, se caracterizan por contener hidrolasas y proteasas a su pH óptimo de funcionamiento (alrededor de 4,5-5). Generalmente los endosomas LAMP-1 positivos son degradativos pero existen excepciones en dónde hay proteínas que son capaces de acumularse a modo de reservorio como se ha mencionado para el caso de PLP (Winterstein, y col., 2008, White and Kramer-Albers, 2014).

Si bien las vesículas Rab7 positivas pueden madurar hacia endosomas de tipo degradativos también pueden dirigirse hacia la red de trans-Golgi o bien hacia la formación de cuerpos multivesiculares (MVB: *multivesicular bodies*). Estos MVB podrían dar lugar a la exocitosis de microvesículas denominadas exosomas. Sin embargo, el origen de los exosomas aún no se encuentra dilucidado completamente. Estos exosomas contienen proteínas características, tanto solubles como de membrana, como la TT CD63. En paralelo, parte de las proteínas presentes en los endosomas tempranos pueden ser recicladas hacia la membrana plasmática. Las principales vías son la vía de reciclado lento caracterizada por los endosomas que contienen a Rab11 en su membrana y la vía rápida caracterizada por los endosomas Rab4 positivos. La mayor diferencia entre estas vías es su dinámica y vida media (Maxfield and McGraw, 2004, Huotari and Helenius, 2011, Escudero, y col., 2014, Monteleone, y col., 2017). Cabe destacar

que existe un amplio repertorio de Rabs descritas para el tráfico de moléculas dentro de la red endocítica, nosotros aquí hemos descrito las Rabs de las vías más frecuentes.

Proteínas de la familia proteolipídica y endocitosis.

En particular, la participación de PLP en la formación de la mielina está bajo el control de la señalización neuronal. Asimismo, la interacción entre axones neuronales y precursores gliales es esencial. PLP es requerida en la superficie de los oligodendrocitos durante su diferenciación y mielinogénesis para lo cual su tráfico y direccionamiento dentro de la célula son imprescindibles (White and Kramer-Albers, 2014). PLP se encuentra en la membrana del oligodendrocito particionada en los microdominios de membrana del tipo *lipid rafts*. De forma distintiva, se ha descrito la presencia de PLP en endosomas LAMP-1 positivos a modo de reservorio. Se ha demostrado la inhibición de la endocitosis de PLP en la línea celular Oli-neu que sobreexpresaban PLP tratadas con filipina (Winterstein, y col., 2008). El reciclado desde los endosomas LAMP-1, de PLP, hacia la membrana plasmática es regulado por los axones neuronales. Esta regulación es a través de RhoA que es una GTPasa pequeña homóloga a la familia de Ras del tipo A. RhoA es estimulada por la activación de la quinasa Fyn, del oligodendrocito, luego de recibir estímulos solubles de las neuronas. Es de esta manera que las neuronas son quienes comandan el reciclado de PLP (Winterstein, y col., 2008, Roboti, y col., 2009, White and Kramer-Albers, 2014). Para el estudio de la internalización de PLP, Winterstein y colaboradores, utilizaron un ensayo de inmunointernalización. Se utilizó un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítipo extracelular de PLP. Estos ensayos determinaron que PLP se endocita exclusivamente por la vía EIC y comparte localización con Tf (como marcador de endosomas de reciclado) y LAMP-1 (Winterstein, y col., 2008). Además, se ha demostrado que PLP se libera del oligodendrocito en exosomas y podría mediar la comunicación glia-neurona (Trajkovic, y col., 2008, Fruhbeis, y col., 2013).

En cuanto a M6a, de forma similar a PLP, también se ha detectado en exosomas CD63 positivos (Monteleone, y col., 2017). Sumado a esto, está reportado que facilita la internalización al sistema endocítico y el reciclado del receptor opioide tipo μ (MOPr). Esto lo probaron utilizando células HEK293, como modelo, coexpresando de forma estable M6a/MOPr. En estos experimentos se observaron la colocalización del MOPr y M6a tanto en la superficie neuronal como en vesículas y, además, determinaron que la porción TM3, EC2, TM4 y C-terminal de M6a como la responsable de esta interacción. También se observó que la versión truncada de M6a (nM6a) que tiene TM3, EC2 y TM4 inhibió parcialmente la endocitosis del receptor MOPr y de M6a en células HEK293 y neuronas corticales. De estos

resultados se destaca la importancia del C-terminal de M6a en su endocitosis y la del receptor en ambos tipos celulares (Wu, y col., 2007, Liang, y col., 2008).

Antecedentes relacionados con las TTs han demostrado que favorecen la endocitosis de otras moléculas de membrana. Un ejemplo es la TT CD63 que favorece la endocitosis de la subunidad β de la H, K- ATPasa (H, K- β) en células estomacales de ratón que las expresan endógenamente. Se ha determinado que la CD63 interacciona con ésta por ensayos de inmunoprecipitación realizados en células estomacales como en COS-7 que sobreexpresaban ambas proteínas. Se propone que la EMC de H, K- β es gracias a su interacción con CD63, dado que la TT posee un motivo basado en tirosina en su extremo C-terminal (YEVM), como ya se mencionó (Duffield, y col., 2003).

Otros estudios realizados en células HEK293 que expresaban establemente a M6a consistieron en someter al estímulo con un anticuerpo monoclonal que reconoce a M6a (clon 1B4). Luego de dos horas de estímulo se observó el agrandamiento de vesículas EEA-1 positivas que contenían a M6a pero no se detectado en endosomas LAMP-1 positivos (Sato, y col., 2011b). Existen evidencias de que M6a podría ser susceptible a la EMC, ya que coinmunoprecipita con la cadena pesada de clatrina. En contraposición, se ha descrito la partición de M6a en dominios discretos de membrana plasmática *lipid rafts* lo que la haría susceptible a la EIC. Sin embargo, hasta el momento no se ha estudiado la endocitosis y tránsito de M6a a través de la red endocítica. Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos, en este trabajo de tesis, indagamos sobre los posibles mecanismos de endocitosis y reciclado de M6a. A su vez, estos mecanismos podrían modificar su concentración en la membrana plasmática y traer consecuencias funcionales y estructurales en las neuronas del hipocampo.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis.

La hipótesis de este trabajo de tesis es que los efectos plásticos asociados a M6a están comandados por señales que recibe a través de su EC2. Existen moléculas fisiológicas, como ligandos, que actúan sobre éste y modulan la función plástica de M6a acompañando al desarrollo neuronal. Además, que M6a posee un sistema de endocitosis y reciclado particular que le permite variar su concentración en la superficie neuronal y por ende modular su función plástica. Este sistema dinámico, le permite a M6a ser redirigida hacia donde su función sea requerida. De esta manera, por presencia o ausencia, M6a es capaz de actuar positiva o negativamente sobre la plasticidad estructural en las neuronas del hipocampo.

Objetivo principal.

En este trabajo de tesis doctoral nos focalizamos en estudiar y caracterizar la endocitosis y reciclado de M6a en la membrana neuronal, y cómo esto se relaciona con la formación y mantenimiento de las sinapsis en cultivo de neuronas de hipocampo maduras.

Objetivos específicos.

1. Estudiar la endocitosis de M6a y sus consecuencias funcionales en cultivo primario de neuronas de hipocampo.
2. Caracterizar la vía de endocitosis de M6a dependiente de vesículas revestidas de clatrina.
3. Caracterizar la vía de endocitosis y reciclado de M6a.
4. Estudiar la posible degradación de M6a luego de su internalización.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales.

Se utilizaron ratas hembras de 18-19 días de preñez de la cepa exocriada Sprague Dawley adquiridas en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires (FFyB-UBA), Argentina. Todos los procedimientos con animales fueron llevados de acuerdo a la guía del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos de Norte América (NIH-publicación N° 80-23) y aprobados por el comité institucional para el cuidado y uso de animales de experimentación de la Universidad Nacional de General San Martín (CICUAE-UNSAM N° 03/2015), Buenos Aires, Argentina.

Reactivos y anticuerpos.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron:

Anticuerpo	Hecho	WB ¹	IFI ²	CF ³	Empresa
anti-M6a-mAb IgG2a	rata	---	1/250 o 1:1000	1 µg/ml	MBL ⁴
IgG2a-mAb (isotipo)	rata	---	---	1 µg/ml	MBL
anti-sinaptofisina	conejo	1:1000	1:200	---	SySy ⁵
Anti-NMDA-R1-mAb	ratón	1:500	1:500	---	SySy
anti-tubulina-mAb	ratón	1:2000	---	---	Sigma ⁶
anti-M6a C-terminal	conejo	1:1000	----	---	Laboratorio
anti-calnexina	conejo	1:2000	---	---	Sigma
Anti-Tf-R-mAb	ratón	1:700	---	---	Invitrogen ⁷
anti-Rab5 (C8B1)-mAb	conejo	1:1000	1:1000	---	Cell Signaling ⁸
anti-HC clatrina	conejo	---	1:700	---	Cell Signaling
anti-LAMP-1	ratón	1:100	1:200	---	Hybridoma
anti-EEA-1-mAb	ratón	---	1:700	---	BD ¹⁰
anti-EEA1	conejo	---	1:1000	---	Cell Signaling
anti-GFP	conejo	1:500	---	---	Invitrogen

¹ Western blot.

² Inmunofluorescencia.

³ Citometría de Flujo.

⁴ Medical and Biological Laboratories, Nagoya, Japón.

⁵ Synaptic System, Goettingen, Alemania.

⁶ Sigma, Munich, Alemania.

⁷ Invitrogen, Leiden, Noruega.

⁸ Cell Signaling Technology, Danvers, Estados Unidos.

⁹ Hybridoma Bank, Iowa University, Iowa, Estados Unidos.

¹⁰ BD Biosciences, Estados Unidos.

Los anticuerpos secundarios pre absorbidos fueron:

Anticuerpo	Hecho en	WB	IFI	CF	Empresa
Alexa 633 anti ratón	cabra	---	1:1000	---	Molecular Probes ¹¹
Alexa 647 anti ratón	cabra	---	1:1000	---	Invitrogen
Alexa 488 anti rata	cabra	---	1:1000	1:500 o 1:1000	Invitrogen
Alexa 568 anti conejo	cabra	---	1:1000	---	Invitrogen
Alexa 568 anti cabra	pollo	---	1:1000	---	Invitrogen
Rhodamina anti rata	cabra	---	1:1000	---	Jackson ¹²
Alexa 488 anti ratón	cabra	---	1:1000	---	Invitrogen
anti-ratón-680	cabra	1:15000	---	---	Li-Cor ¹³
anti-conejo-800	cabra	1:15000	---	---	Li-Cor
anti-ratón-HRP	cabra	1:5000	---	---	Sigma
anti-conejo-HRP	cabra	1:16000	---	---	Sigma

Los reactivos utilizados fueron: LysoTracker® *Deep Red* (75 nM-2 μ M, Invitrogen) y transferrina conjugada a Alexa 647 (Tf-647 50 μ g/ml, Invitrogen). Metil- β -ciclodextrina (5 mM, MCD), monensina (50 μ M), filipina (5 μ g/ml) y cicloheximida (10 μ M) todos adquiridos en Sigma. El colorante vital 7-AAD fue gentilmente donado por el Laboratorio del Dr. Oscar Campetella adquirido en BioLegend (7-aminoactinomicina, 0,05 μ g/ml, BioLegend, San Diego, USA). Paraformaldehído (PFA, ampollas de solución *stock* 16 %, Electron Microscopy Sciences, Pensilvania, USA). Buffer MES (90% metanol y 10 % MES, 100 mM MES, pH: 6,9, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, todos de Sigma). *Cocktail* de inhibidores de proteasas (0,5 μ l/ μ g, Sigma).

Plásmidos.

Los plásmidos de expresión utilizados fueron: plásmido que codifica a la proteína M6a silvestre (WT) y la mutante de M6a que tiene a la tirosina en la posición 251 reemplazada por una alanina (Y251A). Ambas secuencias codificantes fueron clonadas en el extremo C-terminal de la proteína fluorescente verde o roja (plásmido RFP/EGFP-C1 con el promotor CMV) en marco de lectura (Formoso, y col., 2015a). Rab5-GFP, Rab7-GFP (Escudero, y col., 2014) y Rab11-GFP (Lazo, y col., 2013) fueron generosamente donados por la Dra. Francisca Bronfman (Pontificia Universidad Católica de Chile). LAMP1-GFP (Rodriguez-Walker, y col., 2015) fue amablemente cedido por

¹¹ Thermo Fisher, Estados Unidos.

¹² Jackson Laboratories, Estados Unidos.

¹³ Li-cor, Lincoln, Estados Unidos.

el Dr. José Luis Daniotti (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) del laboratorio del Dr. Juan S. Bonifacino (NIH, Bethesda, Estados Unidos). La identidad de todas las construcciones fue verificada por secuenciación de ADN mediante el servicio externo de la empresa Macrogen (Seoul, Korea).

Cultivos celulares y transfección.

Cultivo primario de neuronas de hipocampo.

Los cultivos primarios de neuronas fueron realizados como se ha descrito previamente (Alfonso, y col., 2005a). Brevemente, los cultivos neuronales fueron preparados a partir de hipocampos de embriones de rata Sprague Dawley (E18-19) luego de su sacrificio. Para esto se realizó la disección de los hipocampos de cada embrión y luego el tejido fue tratado con tripsina-EDTA (0,25 %, Gibco, Walkersville, MD, Estados Unidos) a 37°C durante 15 minutos para su disgregación química. Luego de la disgregación química se hicieron tres lavados con el buffer HBSGK (Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, KCl 3 mM, glucosa 2 mM, pH: 7,4), durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se colocaron entre 1 y 2 ml de medio neurobasal con suero (NB, Invitrogen) suplementado con 2 mM de glutamina, 5 mg/ml gentamicina (Sigma) y 10 % (v/v) de suero de caballo (Gibco). En estas condiciones, fueron disgregados mecánicamente con pipeta p1000 (100 veces). Una vez obtenida la solución con células disgregadas, se calculó su densidad celular, a partir de 10 µl de la suspensión en un hemocitómetro (cámara de Neubauer).

Las células fueron sembradas, en vidrios y/o placas de cultivo previamente tratados con 0,1 mg/ml de poli-L-lisina bromhidrato (Sigma) y 20 mg/ml de laminina (Invitrogen) que favorecen su adherencia. Luego de 2 horas, el medio con suero se reemplazó por medio definido (NB1X con 1 g/l ovoalbúmina; N2 y B27) que son suplementos libres de suero de Invitrogen. Se estimó que más del 90 % de las células en el cultivo primario eran neuronas, por sus características morfológicas.

Transfección de neuronas.

Las transfecciones de sólo M6a-GFP/RFP o las cotransfecciones con Rab5-GFP, LAMP1-GFP o Rab7-GFP o Rab11-GFP fueron realizadas con Lipofectamina 2000 (Invitrogen) según las indicaciones del fabricante. Se realizaron en placas de 24 pocillos

conteniendo $1,5 \times 10^4$ neuronas, de 15 DIV, sembradas en vidrios de 8 mm acondicionados. Brevemente, se prepararon dos soluciones, la solución A: contenía 3 μg de ADN plasmídico total y 50 μl de Opti-MEM® (una modificación de los medios esenciales mínimos de Eagle, con el *buffer* HEPES y bicarbonato de sodio, y complementados con hipoxantina, timidina, piruvato de sodio, L-glutamina, oligoelementos y factores de crecimiento adquirido en Invitrogen) por pocillo (placas de 24 pocillos). La solución B: contenía 50 μl de Opti-MEM® y 1 μl de Lipofectamina 2000 por pocillo. Se incubó a la solución A y B por separado durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, la solución B fue disuelta en la solución A y se incubó a la mezcla durante al menos 25 minutos, a temperatura ambiente, para permitir la formación de los liposomas. De cada pocillo, en donde estaban incubándose las neuronas, se retiraron 200 μl de medio condicionado y se los reservó hasta el momento del cambio de medio de transfección. Luego, en cada pocillo se agregaron 100 μl de la mezcla A+B y se incubaron por un período de entre 4-6 horas en estufa a 37°C. Transcurrido ese periodo de tiempo, el medio de transfección fue reemplazado por medio condicionado (500 μl). Es de destacar que la viabilidad de las neuronas mejoró cuando el medio fue condicionado en vez de medio fresco. La proporción que se utiliza normalmente en el laboratorio es de 2:3 (200 μl de medio condicionado y 300 μl de medio definido fresco). Luego de la incubación durante toda la noche (al menos 16 horas) a 37°C fue corroborada la transfección en un microscopio invertido de fluorescencia. La eficiencia de transfección fue la esperada, entre el 1-3 %.

Cultivo de la línea celular HEK293.

La línea celular embrionaria de riñón humano (HEK293) se mantuvo en medio de cultivo DMEM (medio Dulbecco's Eagle modificado, Invitrogen) suplementado con alta concentración de glucosa, 0,45 % (m/v), 200 mM, L-alanina-L-glutamina (GlutaMAX, Invitrogen), 10 % (v/v) de suero fetal bovino (Natocor, Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina) y el antibiótico gentamicina 5 mg/ml (Sigma).

Transfección de células HEK293.

Para las transfecciones transitorias de la línea celular HEK293 utilizamos polietilenimina (PEI, FFyB-UBA, Argentina) según las indicaciones del fabricante. Sembramos entre $1-4 \times 10^4$ células por pocillo en placas de 24 pocillos que contenían

vidrios de 8 mm de diámetro. Brevemente, se realizó una mezcla de transfección que contenía 2 µg ADN plasmídico total, 3 µl de PEI (25 mM) y 50 µl de Opti-MEM® por pocillo de placas de 24 pocillos. Esta mezcla fue incubada durante 8 minutos a temperatura ambiente. Luego, a la mezcla se le agregó 200 µl de DMEM suplementado y se colocó gota a gota en cada pocillo que contenía las células (250 µl por pocillo). Las células con la mezcla de transfección fueron incubadas durante 2 horas a 37°C, seguido del cambio de medio por medio fresco suplementado. También hicimos transfecciones en placas de 60 mm de diámetro al 60 % de confluencia aproximadamente ($1-2 \times 10^6$ células). Para tal caso, se utilizaron 10 µg de ADN plasmídico, 10 µl de PEI y 500 µl de Opti-MEM®. Luego de la incubación de 8 minutos a temperatura ambiente se le agregó 1 ml de medio DMEM suplementado fresco y se colocó en la placa durante 2 horas a 37°C hasta el cambio del medio. En ambos casos, 16 horas más tarde, las células HEK293 fueron observadas en un microscopio de fluorescencia para evaluar transfección. Las células tuvieron una eficiencia de transfección esperada de entre el 30-70 %.

Internalización mediada por anticuerpo (AIA).

El ensayo de inmunointernalización mediada por anticuerpo se utilizó con distintos fines como se detallará. Para evaluar la endocitosis de M6a, se realizó el AIA en neuronas que expresan M6a endógena o células que sobreexpresan M6a-GFP/RFP de forma transitoria (neuronas o células HEK293). Para todos los ensayos se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-M6a-mAb (1 µg/ml, MBL) que reconoce estructuralmente el bucle extracelular mayor de M6a. Las células fueron incubadas a 4°C durante 30-45 minutos con el anti-M6a-mAb en el medio adecuado para cada tipo celular.

En el caso de M6a endógena, luego de la exposición al anticuerpo monoclonal, las neuronas fueron incubadas con un anticuerpo secundario (anti-rata IgG hecho en cabra) acoplado a Alexa 488 a 4°C durante 45-60 minutos como se muestra en el esquema de la Figura 6. Luego de esto, las neuronas fueron mantenidas en frío durante una hora (T0) o incubadas a 37°C durante 30 minutos, 1 hora (T1) o *Wash out* (WO_{4h} o WO_{20h}). Con el objetivo de prevenir (T0) o permitir la endocitosis (T30 y T1) o permitir el tráfico de los complejos (WO_{4h} o WO_{20h}). Luego del WO se expuso a las neuronas al anti-M6a-mAb durante 30-45 minutos nuevamente y 1 hora al anticuerpo secundario verde. Finalizado el tiempo de incubación las células fueron enfriadas en hielo para detener el movimiento de las membranas. Con el objetivo de detectar M6a remanente en la membrana se realizó la inmunomarcación con un anticuerpo terciario. Este reconoció la región constante del

anticuerpo secundario, anti-cabra conjugado a Alexa 568 IgG hecho en pollo, durante 1 hora a 4°C. Por último las células se acondicionaron para inmunofluorescencia.

Las inmunofluorescencias de células que sobreexpresaban M6a-GFP/RFP sólo o bien cotransfecciones (Rab5-GFP, Rab7-GFP, Rab11-GFP o LAMP1-GFP) fueron realizadas tanto en neuronas como en células HEK293. Luego de la exposición al anti-M6a-mAb, las células fueron mantenidas en frío (T0) o bien incubadas a 37°C durante 30 minutos, 1 hora (T30 o T1) o WO (WO_{4h}) en presencia de cicloheximida 10 µM. En el caso de las células HEK293 también se realizó el ensayo en presencia o ausencia de los inhibidores de la EMC (metil-β-ciclodextrina o monensina) o de la EIC (filipina). Luego de los tiempos experimentales, las células fueron mantenidas en frío. Con el objetivo de detectar M6a sobreexpresada remanente en la membrana se realizó la inmunomarcación con un anticuerpo secundario. Éste reconoció la región constante del anticuerpo neutralizante (anti-rata conjugado a Alexa 488 IgG -verde- o anti-rata Rodamina IgG -rojo-) durante 1 hora a 4°C. Finalmente, las células fueron fijadas y acondicionadas para inmunofluorescencia.

Para el caso de citometría de flujo de neuronas 1/2 DIV-5 DIV, luego de la incubación con el anti-M6a-mAb o el control de isotipo, las neuronas fueron mantenidas en frío durante una hora (T0) o incubadas a 37°C durante 1 hora (T1) o WO_{20h}. Como paso siguiente, a las células del grupo WO se las re expuso al anti-M6a-mAb, en frío, y luego se las incubó con un anticuerpo secundario anti-rata conjugado a Alexa 488. Por último las células fueron acondicionadas para citometría de flujo.

Para el caso de células HEK293 que sobreexpresaban M6a-GFP (HEK293-M6a-GFP) sembradas en placas de 60 mm de diámetro al 60 % de confluencia, luego de la exposición al anti-M6a-mAb se las incubó a T0, T1, WO_{4h} en presencia de cicloheximida. Posteriormente las células fueron acondicionadas para citometría de flujo o *Western blot*. En el caso de neuronas de 15 DIV sembradas en placas de 100 mm de diámetro se procedió del mismo modo y luego fueron acondicionadas para *Western blot* o para centrifugación diferencial en gradiente discontinuo de sacarosa.

Cuantificación del porcentaje de M6a en la superficie celular.

Se utilizaron células HEK293-M6a-GFP/RFP o la mutante HEK293-Y251A-GFP/RFP que fueron sometidas al AIA (T0, T1, WO_{4h}) para la cuantificación del porcentaje de endocitosis. Para ello se obtuvieron imágenes de células aisladas con un microscopio confocal (como se detalla en la sección de procesamiento de imágenes). Se

seleccionaron al menos 10-20 células por condición y se cuantificó el porcentaje de M6a en la superficie relativizándolo a la fluorescencia total por célula ensayada. Cada experimento fue realizado a ciegas para el operador y se realizaron al menos tres experimentos independientes donde se obtuvieron resultados similares.

Inhibidores de la EMC y la EIC: A partir de células HEK293-M6a-GFP/RFP realizamos ensayos de AIA en presencia o ausencia de inhibidores selectivos de la EMC junto con transferrina acoplada a un fluoróforo (Alexa 647, Tf-647). Utilizamos metil- β -ciclodextrina, 5 mM y monensina 50 μ M que inhiben la EMC y filipina 5 μ g/ml que inhibe la EIC. Tanto los inhibidores como la Tf-647 fueron agregados, luego de la exposición al anti-M6a-mAb, al momento del cambio de medio de cultivo. Cada experimento realizado con inhibidores fue realizado en paralelo con su control (ausencia de inhibidores). Luego del AIA se evaluó el porcentaje de internalización de M6a como se explicará en procesamiento de imágenes.

Cuantificación de la colocalización de M6a con distintas proteínas de las membranas endosomales luego del AIA.

Tanto células HEK293 como neuronas que sobreexpresaban a M6a-RFP sola o coexpresaban Rab5-GFP, Rab7-GFP, Rab11-GFP, y LAMP-1-GFP fueron sometidas al AIA.

Además, en células que sobreexpresaban M6a-GFP utilizamos durante el AIA a los reactivos Tf-647 y LysoTracker® *Deep Red* a modo de *screening* o realizamos inmunodetecciones de proteínas endógenas luego del AIA como clatrina, Rab5, EEA-1 y LAMP-1.

Posteriormente, en todos los casos las células fueron acondicionadas para inmunofluorescencia como se explicará a continuación. A partir de células HEK293, luego de la adquisición de imágenes, se calculó la colocalización de los marcadores endocíticos o los reactivos fluorescentes con M6a-GFP/RFP con el *plugin* ComDet que se detalla más adelante.

Inmunofluorescencia.

Las inmunofluorescencias fueron realizadas tanto para neuronas como para la línea HEK293. La fijación la realizamos con una solución de PFA-4 % - sacarosa 4 % en PBS (138 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄) durante 8-10 minutos a

4°C. Luego de la fijación realizamos tres lavados con PBS. El paso de permeabilización de las membranas, si hubiera sido necesario, se realizó con Triton X-100 al 0,1 % diluido en PBS durante 2 minutos. Luego de tres lavados con PBS se realizó el bloqueo con una solución 3 % BSA (sero-albúmina bovina), 2 % gelatina de pescado diluida en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. La preparación de los anticuerpos primarios (M6a, Rab-5, EEA-1 o la cadena pesada de clatrina) fue realizada en una solución 1 % BSA y fue incubada a 4°C durante toda la noche. Cuando el anticuerpo primario fue el de LAMP-1, la solución se preparó en 1 % de BSA suplementada con el detergente de permeabilización reversible suave saponina 0,2 % y se incubó durante toda la noche. Al día siguiente se realizaron tres lavados con PBS seguidos de la incubación de los anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos, que fueron preparados en una solución de 1 % BSA, durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con PBS y se montaron los cubreobjetos con las células fijadas e inmunomarcadas con Fluorsave® (Calbiochem, Darmstadt, Alemania). De este modo las células quedaron listas para ser observadas en microscopio de fluorescencia confocal.

Inmunofluorescencia para cuantificación de sinapsis.

Para la detección de sinapsis fue necesario adaptar el protocolo de inmunofluorescencia, ya que la proteína post sináptica NMDA-R1 no se logra detectar con las condiciones antes descriptas. Hemos seguido las recomendaciones del fabricante, Synaptic System, como ya lo hicimos en un trabajo previo (Formoso, y col., 2016). Es decir, las sinapsis fueron evaluadas en cultivos de neuronas de 15 DIV a baja densidad (en placas de 24 pocillos se sembraron 7.000 neuronas en cada uno). Las neuronas fueron sometidas a AIA y luego de la fijación se detectó a M6a endógena en la superficie celular seguido de la marcación con el anticuerpo Alexa 488-anti rata. Éste reconoció la porción constante del anti-M6a-mAb producido en rata. Luego se lavó el anticuerpo secundario con PBS filtrado dos veces y se fijó con el buffer MES a 4°C durante 5 minutos. Como paso siguiente las neuronas fueron lavadas 3 veces con PBS filtrado, con el agregado del detergente Tween-20 (0,1 %), durante 5 minutos cada lavado. Para bloquear se utilizó primero una solución de SFB (suero fetal bovino) con el agregado de Tritón X-100 (SFB 10 %, Tritón X-100 0,1 % en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente y luego se incubó con una solución de BSA 3 % también en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Ambas soluciones de bloqueo fueron previamente centrifugadas durante 10 minutos a velocidad máxima. Luego fueron incubadas 12-16 horas a 4°C con el

anticuerpo primario anti-sinaptofisina hecho en conejo (marcador pre sináptico) y con el anticuerpo anti-NMDA-R1 hecho en ratón (marcador post sináptico). Ambos anticuerpos fueron preparados en una solución PBS-BSA 1 % y centrifugados durante 10 minutos a velocidad máxima. Luego de lavar 3 veces con PBS filtrado los preparados se bloquearon nuevamente con BSA 3 % y con la solución FBS 10 %-Tritón X-100 0,1 %-PBS durante 1 hora a temperatura ambiente ambas soluciones fueron centrifugadas durante 10 minutos. El paso siguiente fue incubar con los anticuerpos secundarios anti-ratón conjugado a Alexa 633 y anti-conejo conjugado a Alexa 568 preparados en 1 % BSA y centrifugados 10 minutos a velocidad máxima. La concentración se detalla en la tabla de anticuerpos primarios y secundarios. Luego fueron lavados con PBS filtrado durante 10 minutos a temperatura ambiente y por último fueron montados como ya se describió.

Procesamiento de imágenes.

Adquisición de imágenes.

Las imágenes de las células fueron obtenidas con un microscopio confocal Olympus FV1000 asociado a un microscopio invertido Olympus IX81 con un objetivo de 60 X de apertura numérica de 1,42. Ajustamos los parámetros desde el *software* asociado al microscopio Olympus fluoview v3.1a para que la velocidad de adquisición por posición fuera de 4-10 $\mu\text{s}/\text{pixel}$. Hicimos un ajuste manual de la energía del láser (HV, ganancia y punto de corte) mediante la utilización de preparados que fueron únicamente marcados con los anticuerpos secundarios. Con esto se determinó la señal de punto de corte la cual fue aplicada para cada imagen en el experimento. Los niveles de saturación fueron mantenidos con el modo “Auto HV” que posee el *software*. Las imágenes fueron adquiridas con un modo de sobreescaneo que satisfizo el criterio de Nyquist siendo el tamaño del pixel entre 2-3 veces más pequeño que el objeto a analizar (Bolte and Cordelieres, 2006, Pike, y col., 2017).

Generación de perfiles RGB.

Para neuronas, se tomaron imágenes de 1600*1600 pixeles con una velocidad de 4 $\mu\text{s}/\text{px}$ con un zoom de 2X (tamaño del pixel 0,066 $\mu\text{m}/\text{px}$). En el caso de células HEK293-M6a-GFP/RFP se utilizó un aumento de 4X y el tamaño de la imagen fue de 1024*1024 pixeles (tamaño del pixel 0,041 $\mu\text{m}/\text{px}$). En todos los casos, se tomó un área

representativa de cada condición ensayada T0, T1 y WO y se trazó una línea recta de 15 μm . A lo largo de esta recta se midieron las intensidades de fluorescencia para cada canal (perfil RGB) con el *software* ImageJ2 o FIJI (Schindelin, y col., 2012). De esta manera se determinó cualitativamente la distribución de M6a total y M6a remanente en la superficie. En cada gráfico generado, siempre se representó a M6a total en color verde y a M6a en la membrana plasmática en color magenta.

Cuantificación del porcentaje de M6a en la superficie celular en células HEK293.

Células HEK293-M6a-GFP o HEK293-Y251A-GFP en las distintas condiciones detalladas anteriormente (presencia o ausencia de inhibidores) fueron procesadas con el *software* FIJI. La adquisición de imágenes se hizo con los parámetros detallados en la generación de perfiles RGB para células HEK293. La cuantificación se hizo a partir de imágenes obtenidas por microscopia confocal en un sólo plano. El plano se definió en función de que el núcleo celular se vea representado en su mayor diámetro (ecuador celular). Para esto, se hicieron tinciones del ADN con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, Sigma) que fluoresce en azul o con verde de metilo que fluoresce en rojo lejano (Prieto, y col., 2014). Estas imágenes fueron convertidas a escala de grises de 8-bit de profundidad. Una región de interés fue definida en el perímetro externo de la célula y fue cuantificada la intensidad de fluorescencia total (FT). Otra región de interés fue definida en el citoplasma y fue cuantificada la intensidad de fluorescencia total citoplasmática (FC). La razón entre $(FT/FC)*100$ de la fluorescencia total correspondiente a la proteína exógena (M6a o Y251A) fue calculada y expresada como porcentajes (Miserey-Lenkei, y col., 2001, Leterrier, y col., 2004). Estos porcentajes representan la proporción de M6a en la superficie celular. Se cuantificaron de 10 a 15 células por condición en al menos tres experimentos independientes. Los análisis fueron realizados a ciegas para el operador y los análisis estadísticos se muestran en cada epígrafe.

Cuantificación de la colocalización de M6a con distintos proteínas de membranas endosomales.

Para el caso de la cuantificación de la colocalización de M6a con los distintos marcadores endocíticos en células HEK293 se utilizó el *plugin* ComDet c0.3.6.1 (<https://github.com/ekatruxha/ComDet/wiki>) (Esteves da Silva, y col., 2015). Las condiciones de la adquisición de imágenes fueron un aumento de 4X y el tamaño de la

imagen fue de 1024*1024 pixeles (tamaño del pixel 0,041 $\mu\text{m}/\text{px}$). Para cada imagen (*z-stack* entre 4-6 *slides* o secciones ópticas) se hicieron composiciones donde a M6a se le asignó el color verde (canal 1 para el *plugin*) y a cada marcador endocítico el color rojo (canal 2 para el *plugin*). Por ejemplo en el caso de la Figura 25, se calculó la colocalización de M6a-RFP, que se le asignó el color verde y clatrina (anti-conejo-Alexa 488) que se le asignó el color rojo.

Las partículas o clústeres de proteínas fueron detectadas por el *plugin* en el canal verde y rojo independientemente. El tamaño seleccionado de los clústeres fue de 4 pixeles, ya que es un tamaño compatible con un endosoma (4 pixeles son del orden de 200 μm en las condiciones de adquisición de imágenes). Además, se ajustó el parámetro que tiene en cuenta la relación señal a ruido entre 4-5, considerando las características de las imágenes obtenidas. La colocalización fue determinada basándonos en la máxima distancia entre los centroides de clústeres de 4 px. El programa arroja los porcentajes de colocalización entre un canal y el otro teniendo en cuenta los parámetros antes mencionados.

Teniendo en cuenta los parámetros indicados determinamos un punto de corte a partir de la cuantificación de la colocalización entre Rab5 y LAMP-1. Por bibliografía sabemos que estos marcadores no comparten endosomas. Cuando realizamos la cuantificación de la colocalización, de Rab5 con LAMP-1 ($n=24$), obtuvimos menos del 3 % de colocalización (tanto a T0: $2,54 \pm 0,37$, $n=24$; como a T1: $1,96 \pm 0,28$; $n=26$). Es decir, en función a estos resultados decidimos que porcentajes menores al 4 % como no colocalización. En el epígrafe de cada figura donde se analizó la colocalización se muestran los parámetros estadísticos. Cada colocalización, entre M6a y el marcador endocítico específico, se realizó al menos en tres experimentos independientes. El procesamiento de las imágenes fue realizado a ciegas para el operador. En cada figura se muestra la cuantificación de un experimento independiente representativo.

Análisis y procesamiento de imágenes de sinapsis.

La adquisición de imágenes fue similar a la detallada para la generación de perfiles RGB en neuronas. La cuantificación del número de sinapsis se realizó como la colocalización de clústeres sinaptofisina con clústeres de NMDA-R1 en las espinas dendríticas o en el cuerpo de las dendritas. Estas colocalizaciones se cuantificaron a lo largo de 25 μm de dendrita. Para ésto se tomaron imágenes de neuronas que se encontraran al menos a dos somas de la neurona vecina más próxima en los tres canales

del microscopio confocal (verde, rojo y rojo lejano). A partir de estas fotos, se seleccionaron entre 2-3 ROIs (por *region of interest*) de 25 μm por cada neurona, de entre 10-15 neuronas por condición. Para cada fragmento seleccionado se hicieron composiciones RGB donde a M6a se le asignó el color verde, a sinaptofisina el color rojo y a NMDA-R1 el color azul. Para las cuantificaciones de los clústeres y su colocación se utilizó el *plugin Puncta Analyzer* del *software FIJI*. A las imágenes se les eliminó el *background* de forma automática. Como paso siguiente se determinaron los umbrales de fluorescencia de forma manual para cada uno de los canales a analizar. Sumado a esto, se le asignó un número mínimo de 4 píxeles de superficie para que el programa determine un clúster. El *plugin* calcula por separado el número de clústeres para cada canal y la cantidad de colocaciones entre clústeres. Este protocolo se basa en el trabajo de Ippolito y Eroglu y lo adaptamos, en un trabajo previo, a nuestras condiciones experimentales (Ippolito and Eroglu, 2010, Formoso, y col., 2016). Al menos tres experimentos independientes fueron realizados y la cuantificación fue realizada a ciegas para el operador. Los parámetros estadísticos se muestran en cada epígrafe.

Las imágenes representativas de cada experimento fueron procesadas en Adobe Photoshop versión 8.0.1 y Adobe Illustrator CS5 versión 15.0.0 (Adobe Systems, San José, CA, USA), para hacer los paneles de las figuras.

Citometría de flujo.

Cuantificación del porcentaje de M6a en la membrana plasmática neuronal.

Con el objetivo de cuantificar el porcentaje de M6a en la membrana se sometió a las neuronas al AIA adaptado para citometría de flujo como se explicó (ver Figura 14). Para ésto, se sembraron neuronas de hipocampo 1×10^6 en placas de 6 pocillos y se mantuvieron durante 1/2 o 5 DIV y se las sometió al AIA. Pasados estos períodos se cosecharon las neuronas mecánicamente con *scraper* en un volumen mínimo de PBS frío. Una vez resuspendidas las células fueron centrifugadas a 500 g a 4°C durante 10 minutos en un tubo tipo Eppendorf (1,5 ml) y nuevamente fueron resuspendidas en solución de fijación. La solución de fijación, estaba compuesta por 2 % de PFA- 2 % de sacarosa en PBS, se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente a resguardo de la luz. Posteriormente se agregó un volumen de PBS para diluir el PFA, al 1 %, quedando las neuronas listas para ser analizadas por citometría de flujo. Hemos realizado en análisis inmediatamente

después de la fijación o 48 horas después de la fijación y los resultados resultaron semejantes. Mediante este análisis se determinó el porcentaje de fluorescencia exclusivamente en la membrana, en el canal FL1 que es capaz de detectar fluorescencia verde (Alexa 488-anti-rata).

Los valores obtenidos de fluorescencia verde en la membrana fueron relativizados al control mantenido a 4°C durante 1 hora (T₀), el cual representa la cantidad total de M6a en la superficie teniendo en cuenta el estadio neuronal (T₀_{DIV}). En el caso en el que se ha retirado el estímulo del anticuerpo monoclonal (WO) y mantenido a las células a 37°C durante 20 horas, los valores fueron relativizados a su respectivo control. El control de las neuronas de 2 DIV (WO) se determinó a partir del T₀_{2DIV} que representa el total de M6a en la superficie neuronal en ese estadio. Para cada experimento se tomó como punto de corte el 5 % de fluorescencia total. Todos los datos fueron expresados como el porcentaje de M6a en la superficie celular (Jung, y col., 1996, Kawauchi, y col., 2010). Para la cuantificación se utilizaron tres experimentos independientes y en el gráfico de barras se muestra la media + SEM. En el epígrafe se muestran los parámetros estadísticos. Los eventos colectados en cada caso han sido en un rango de 15.000-50.000 neuronas por cada condición dependiendo del experimento.

Cuantificación de la viabilidad neuronal.

Con un set de neuronas sin fijar (células sin marcar, T₀ y T₁), se utilizó el colorante vital 7-aminoactinomicina (7-AAD) a una concentración final de 0,05 µg/ml. Este reactivo sólo puede ingresar a células que hayan perdido la integridad de sus membranas plasmáticas. Una vez que ha ingresado es capaz de interactuar con el ADN de las células y emitir luz en el rojo lejano. La excitación del compuesto se realizó con el láser azul del citómetro y la detección de la emisión de fluorescencia se realizó en el canal FL3 (647nm). Se colectaron del orden de 80.000-100.000 eventos por condición en un experimento.

Cuantificación de la concentración de M6a por citometría de flujo en células HEK293-M6a-GFP.

Con respecto a las células HEK293, realizamos un ensayo controlado para evaluar la abundancia de M6a-GFP. Utilizamos placas de 60 mm de diámetro con el 60 % de confluencia transfectadas. Luego del AIA, las células fueron cosechadas con *scraper*,

lavadas con PBS y se dividieron en dos alícuotas iguales. Una de las alícuotas se utilizó para citometría de flujo, como ya se explicó y la otra para *Western blot*.

El análisis por citometría de flujo fue utilizado para determinar la cantidad de M6a-GFP total, por célula, en cada condición experimental evaluada. La cantidad de fluorescencia total a T1 y WO fue relativizada al valor obtenido en T0. Se utilizó el canal FL1 para coleccionar los datos de intensidad de fluorescencia por evento (célula HEK293). Por condición se adquirieron entre 50.000-80.000 eventos en tres experimentos independientes que se representan como la media + SEM. Los datos estadísticos se describen en el epígrafe de la figura.

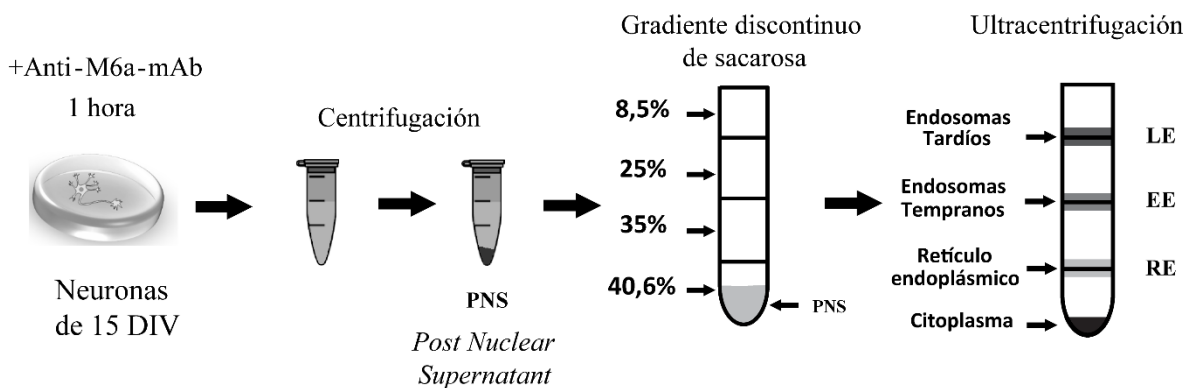
Para todos los estudios realizados por la técnica de citometría de flujo se utilizó un citómetro FlowMax PASIII (Partec, Munster, Alemania) y los datos fueron analizados con el *software* FlowJo versión 10.0.7.

Centrifugación diferencial en gradientes discontinuos de sacarosa.

A partir de cultivos de neuronas de 15 DIV ($2-5 \times 10^6$, sembradas en placas de 100 mm de diámetro), sometidos al AIA, se realizaron las centrifugaciones diferenciales en un gradiente discontinuo de sacarosa. Las neuronas fueron levantadas mecánicamente en un volumen mínimo de PBS con *scraper*. Luego, fueron centrifugadas a 400 g en un tubo tipo Eppendorf de 1,5 ml durante 10 minutos. Al pellet se lo resuspendió en 500 μ l de una solución 8,5 % de sacarosa 3 mM de imidazol. La ruptura y homogeneización de las células se realizó suavemente con una jeringa que contenía una aguja tipo G22 (10 *stockes*). A la solución de homogeneización se le agregó inhibidores de proteasas. Una vez rotas las células, éstas fueron centrifugadas a 2000 g a 4°C durante 10 minutos. Al pellet obtenido, que contiene mayormente los núcleos, se lo descartó, y al sobrenadante se lo denominó PNS (*Post Nuclear Supernatant*). Los 500 μ l de PNS se los diluyó en 1,125 ml de sacarosa al 55 % con imidazol 3 mM. La solución que contenía las proteínas neuronales totales quedó al 40,6 % de sacarosa en un volumen de 1,625 ml y se la colocó en el fondo de un tubo para rotor SW41Ti (13 ml). Muy suavemente se colocaron 3 ml de una solución 35 % de sacarosa 3 mM de imidazol, encima de la solución de 40,6 %, seguido de 4ml de una solución 25 % de sacarosa 3 mM de imidazol. Cabe destacar que las soluciones de distintas concentraciones quedaron separadas por una interfaz es por ello que se lo denomina gradiente discontinuo. Por último, se completó el volumen del tubo con una solución 8,5 % de sacarosa con 3 mM de imidazol (4ml).

Una vez armados los gradientes discontinuos de sacarosa se los equilibró con

balanza analítica. La ultracentrifugación se realizó a 25.000 rpm (77.100 g) durante 3 horas o bien a 35.000 rpm (151.000 g) durante 90 minutos. En cualquier caso, la aceleración del rotor fue la máxima y la desaceleración fue de a pasos de 500 rpm (30 g) cada 5 minutos, con el objetivo de que el gradiente se mantuviera intacto. Una vez pasado el período de ultracentrifugación se colectaron fracciones de 1 ml desde la superficie del tubo. De cada fracción, se reservó una alícuota para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford. Según bibliografía, se espera que entre las fracciones de 40,6/35 % se encuentren las proteínas de retículo endoplásmico (RE), entre las de 35/25 % se encuentren los endosomas tempranos (EE) y entre las de 25/8,5 % se encuentren los endosomas tardíos (LE) (Sobo, y col., 2007). Esto se lo encuentra reflejado en el esquema que representa el fraccionamiento subcelular. Se realizaron dos experimentos independientes.



Precipitación de proteínas.

Se tomó un volumen de muestra proveniente de la centrifugación diferencial y se le agregó medio volumen de TCA (21 % v/v). La mezcla se la homogeneizó con pipeta y se la centrifugó a 15.200 g a 4°C durante 30 minutos. Luego de la centrifugación se resuspendió el pellet obtenido en 10-15 µl de una solución de NaOH 0,2 N con 1 % de dodecilsulfato sódico (SDS). Esta solución permitió neutralizar la acidez remanente del TCA. A esta mezcla, que contenía las proteínas, se le agregó *cracking buffer* (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 25 % glicerol, 2 % SDS, 0,01 % azul de bromofenol) con β-mercaptoetanol y se las hirvió durante 10 minutos. Las muestras fueron luego sometidas a ensayos de *Western Blot*.

Detección de proteínas por Western blot.

En el caso de proteínas que venían de células en placas de cultivo, la extracción de proteínas totales se realizó con el *buffer* de lisis (Tris-Cl pH 7,5 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM y Tritón X-100 1 %), en presencia de inhibidores de proteasas, luego del AIA. En el caso de las muestras provenientes de la centrifugación diferencial ya estaban acondicionadas en *cracking buffer* según lo explicitado anteriormente.

Cualquiera sea el origen de las muestras fueron preparadas del mismo modo. Se tomaron alícuotas de muestras que contenían igual cantidad de proteínas y fueron preparadas en *cracking buffer* con β -mercaptoetanol hirviéndolas durante 10 minutos. Luego de esto las muestras fueron sembradas y separadas en geles de poliacrilamida al 10 o 12 % por SDS-PAGE. Como paso siguiente se transfirieron las proteínas y se realizó la inmunodetección.

Para todos los casos las proteínas, que ya estaban separadas por electroforesis SDS-PAGE, fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Millipore) en sistema húmedo de BioRad. Para el caso de detección con quimioluminiscencia luego de la transferencia las membranas fueron bloqueadas con una solución Tris-5 % leche descremada durante 1 hora en agitación. Posteriormente, las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios diluidos en una solución TBS (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5)-1 % BSA durante toda la noche a 4°C en agitación. Al día siguiente, se realizaron 2 lavados con TBS suplementado con 0,2 % de Tween-20 (T-TBS) y un lavado con TBS. Luego, se incubó a las membranas con anticuerpos secundarios, acoplados a HRP (peroxidasa de rabanito) durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación en una solución de 3 % leche descremada en TBS. Luego de dos lavados con T-TBS y uno con TBS, los complejos antígeno-anticuerpo fueron detectados siguiendo el protocolo estándar de quimioluminiscencia para *Western blot*, usando como sustrato SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) y placas X-OMAT Film (Kodak).

En el caso de que la inmunodetección se haya realizado con el equipo Odyssey, las membranas ya transferidas se bloquearon con una solución de gelatina de pescado 1 % en TBS ó TBS-1 % leche descremada. La posterior incubación con los anticuerpos primarios fue realizada en 1 % de BSA diluida en TBS. La incubación con los anticuerpos secundarios fue realizada en TBS (1:15.000) durante una hora a temperatura ambiente en agitación. Luego de este período las membranas con los complejos (antígenos-anticuerpos) fueron detectados en un escáner de infrarrojo de la marca LiCor y el *software* Odyssey CLx *Imaging System-Image Studio*.

Para las cuantificaciones, se realizaron tres ensayos independientes y con el *software* FIJI se calculó la intensidad de píxeles de las bandas. Se realizó la relativización con la abundancia de tubulina y se expresaron en un gráfico de barras como la media + SEM. Los valores obtenidos se muestran como unidades arbitrarias. En el epígrafe de la figura se detallan los parámetros estadísticos.

Análisis estadísticos.

Los análisis estadísticos fueron realizados con el *software* GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA, USA) y los datos fueron expresados como la media + error estándar de la media (SEM por sus siglas en inglés *standard error media*). Los análisis estadísticos utilizados fueron el ANOVA de una vía seguido del post-test de Bonferroni y en cada epígrafe se mostraran las significancias entre grupos. También utilizamos el T-test de Student para los ensayos en donde fue necesario.

RESULTADOS

M6a se endocita luego del tratamiento neutralizante y ésto se acompaña con la disminución del número de sinapsis en neuronas hipocampales.

Como se describió en la introducción, el sistema de endocitosis y de reciclado en células eucariotas tienen roles fundamentales, tanto sea para la recepción de señales, diferenciación celular y captación de nutrientes, entre otras funciones. En esta misma línea, la endocitosis y el reciclado de proteínas integrales de membrana le permiten a las células eucariotas mantener un equilibrio entre las necesidades fisiológicas y el medio ambiente que la rodea (Maxfield and McGraw, 2004, Huotari and Helenius, 2011, Neefjes, y col., 2017). En particular en las neuronas, que son células altamente diferenciadas y especializadas, el sistema endocítico tiene roles esenciales como la supervivencia, la diferenciación dendrítica y axonal, la migración celular y formación de sinapsis entre otras funciones (Farias, y col., 2012, Cosker and Segal, 2014, Britt, y col., 2016). Asimismo, las neuronas son capaces de coordinar en tiempo y espacio la endocitosis y reciclado y de esta manera controlan y coordinan eventos y estímulos (Cosker and Segal, 2014).

M6a endógena se endocita luego de una hora en presencia del anti-M6a-mAb en cultivo primario de neuronas.

En esta sección nos propusimos caracterizar la endocitosis y reciclado de M6a en cultivos primarios de neuronas de hipocampo. Con este fin, utilizamos neuronas de hipocampo obtenidas a partir de embriones de rata de 18-19 días de desarrollo embrionario. Realizamos ensayos de endocitosis por el método de inmunointernalización o internalización mediada por anticuerpo (llamado de aquí en más AIA: por sus siglas en inglés *Antibody Internalization Assay*). Puntualmente, utilizamos un anticuerpo monoclonal que reconoce el bucle extracelular mayor (EC2) de M6a (anti-M6a-mAb). Diversos trabajos han reportado la inmunointernalización de moléculas de membrana (Winterstein, y col., 2008, Escudero, y col., 2014). Este es el caso de PLP, cuyo sistema de endocitosis y reciclado característico se describió usando este método (Winterstein, y col., 2008). Este sistema le permite asistir al remodelado de la membrana de los oligodendrocitos y concomitantemente define la participación de PLP en la mielinogénesis (White and Kramer-Albers, 2014).

Para el caso de M6a, evaluamos la endocitosis mediante ensayos de inmunofluorescencia y observación en microscopio confocal. Para ello hicimos cultivos primarios de neuronas

maduras¹⁴, durante 15 días *in vitro* (DIV) en cubreobjetos acondicionados para la adherencia de las neuronas. Adaptamos el ensayo de AIA para poder distinguir a M6a endocitada de la remanente en superficie como se muestra en la Figura 6. Las neuronas se incubaron con el anti-M6a-mAb seguido del anticuerpo secundario marcado con un fluoróforo verde. De esta forma, M6a en la superficie estará marcada en verde. Posteriormente, realizamos el cambio de medio y las neuronas se mantuvieron a 4°C (T0 o estado estacionario), o fueron cultivadas a 37°C durante una hora (T1) o durante cuatro horas (WO: *Wash Out*). Tras estos períodos las neuronas fueron mantenidas en frío y se las incubó durante una hora con el anticuerpo terciario marcado con un fluoróforo rojo que permite distinguir a M6a remanente en la superficie. Luego, las células fueron fijadas con una solución que contenía paraformaldehído y sacarosa y fueron montadas con Fluorsafe® para su observación en microscopio confocal.

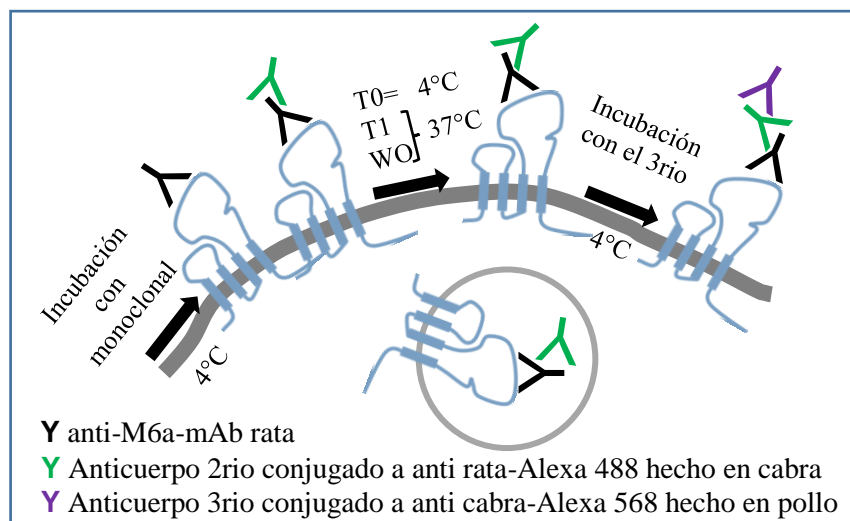


Figura 6: *Inmunointernalización mediada por anticuerpo (Antibody internalization assay: AIA)*. Esquema de la inmunointernalización de M6a mediada por el anti-M6a-mAb. Las células fueron expuestas al anti-M6a-mAb (negro) seguido de la marcación con un anticuerpo secundario (verde). Luego del cambio de medio las células fueron incubadas 1 h a 4°C o 37°C (T0 y T1) o 4 o 20 h en el caso del *Wash Out* (WO). Las moléculas de M6a tanto en superficie como endocitadas se verán verdes. El anticuerpo terciario (anti-cabra-rojo) se une a los complejos que permanecen en superficie (M6a/M6a-mAb) (magenta).

En este trabajo de tesis seguimos las recomendaciones para facilitar la visualización de las imágenes de microscopía a personas que padecen daltonismo. Esto lo hicimos mediante la utilización del color verde y el reemplazo del color rojo de las imágenes por el magenta. En la Figura 7 se muestran imágenes representativas obtenidas por microscopía confocal de neuronas de 15 DIV para cada condición ensayada (T0, T1, WO_{4h}). M6a total (en superficie y endocitada)

¹⁴ Cultivos maduros de neuronas de hipocampo o neuronas se utilizará indistintamente para referirse al cultivo primario de neuronas hipocampales.

se muestra en verde y M6a en superficie, luego del AIA, se muestra en magenta. En las imágenes correspondientes a T0 se puede observar que la distribución de M6a endógena se encuentra restringida a la superficie celular. Esto se distingue mejor en el panel de superposición en donde hay solapamiento completo de los canales, lo que se observa en blanco en la membrana neuronal. En las zonas destacadas en línea de puntos se muestran regiones representativas ampliadas de cada condición. Para más detalle, dentro de éstas

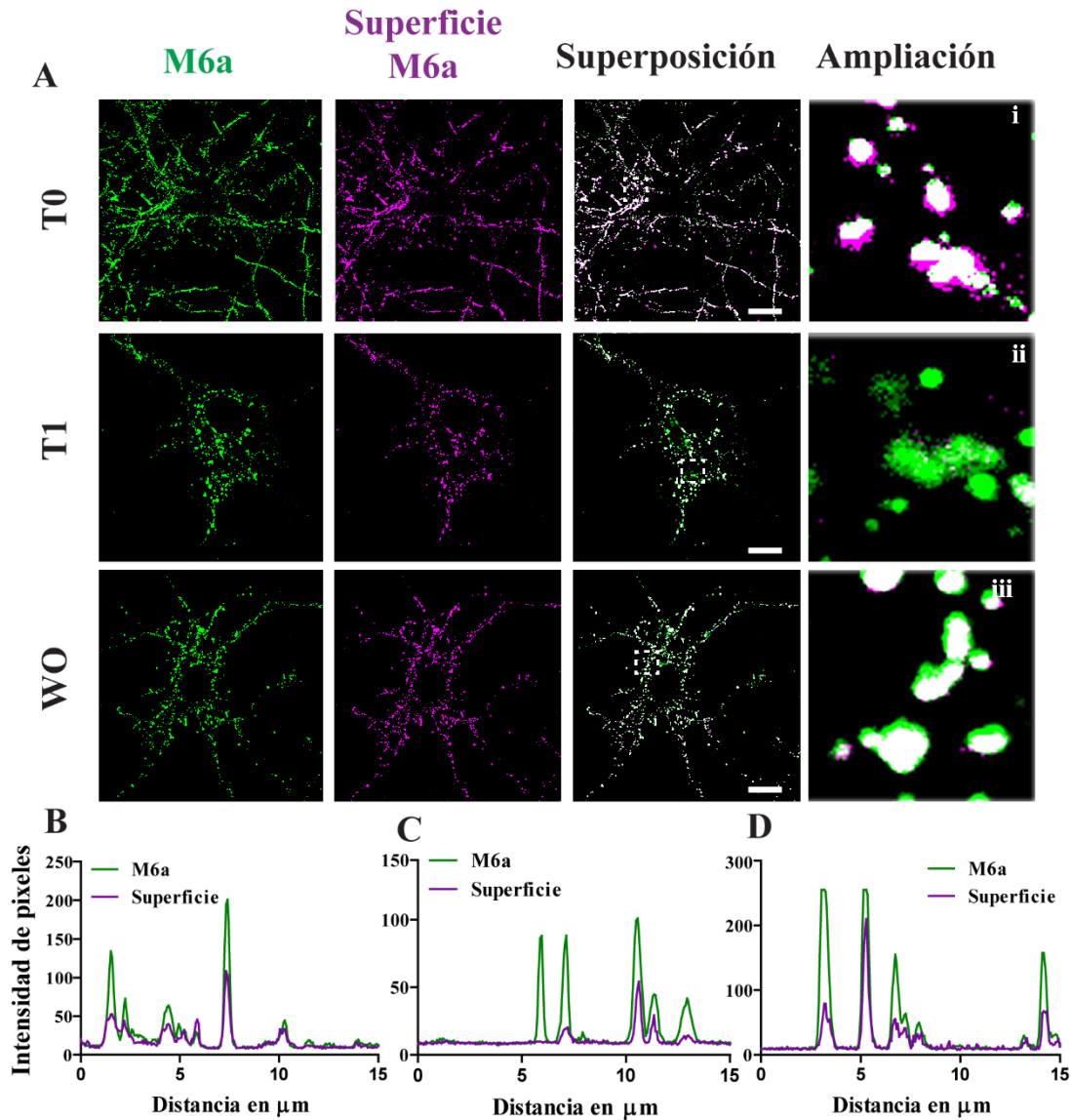


Figura 7: M6a se endocita y luego del $\text{WO}_{4\text{h}}$ se localiza en la membrana plasmática. **A.** Imágenes representativas obtenidas por microscopía confocal de neuronas de 15 DIV sometidas al AIA. M6a total fue marcada con el anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488 (se muestra en verde). M6a remanente en superficie fue marcada (1h a 4°C) con un anticuerpo terciario acoplado a Alexa 568 (se muestra en magenta). Todas las inmunomarcaciones fueron realizadas previo a la fijación. La superposición de los canales se muestra en blanco en la tercera columna. Barra de escala: $15\ \mu\text{m}$. Ampliación $5\times 5\ \mu\text{m}$. **B-D.** Se generaron perfiles RGB con el *plugin RGB generator* del procesador de imágenes FIJI. Fueron superpuestas las imágenes obtenidas de un plano. El perfil fue generado a partir de una línea recta de $15\ \mu\text{m}$ de longitud: T0 (i), T1 (ii) y $\text{WO}_{4\text{h}}$ (iii). Obtuvimos los valores de intensidad de fluorescencia de ambos canales para cada pixel y eso lo representamos en función de la distancia en micrómetros.

trazamos una línea recta de 15 μm y realizamos un perfil RGB. El perfil RGB (*red, green and blue*) fue generado a partir de las imágenes originales. La curva verde representa a la intensidad de fluorescencia por pixel de M6a total, en superficie y endocitada, y la curva magenta a M6a exclusivamente de membrana. A T0 el perfil RGB muestra una coincidencia completa en los picos de intensidades de fluorescencia para cada fluorocromo. En las imágenes correspondientes a T1 se pueden observar tanto en el soma como en las dendritas acúmulos o clústeres de M6a que se observan exclusivamente de color verde. Ésto es más evidente cuando evaluamos los perfiles RGB donde se observan picos de intensidad de fluorescencia verde que no coinciden con el magenta. Esto sugiere que M6a, que se encontraba en la membrana, fue endocitada. Por el contrario, en las imágenes representativas del WO_{4h}, las cuales se les retiró el estímulo del anti-M6a-mAb y se incubaron con medio fresco durante cuatro horas a 37°C, se puede observar una distribución similar al T0. Es decir, se puede ver que M6a total coincide completamente con la marca de superficie y como resultado de la superposición de ambos canales se observa color blanco. El perfil RGB muestra una distribución de las intensidades de fluorescencia similares a T0, ya que los picos verdes y magentas coinciden en su totalidad, confirmando que M6a se encuentra en la superficie celular.

El número de acúmulos de sinaptofisina disminuye en neuronas hipocampales sometidas al AIA.

Se ha descrito en bibliografía que la organización proteica y estructural tanto de la pre como de la post sinapsis es un proceso que involucra múltiples vías de señalización. Sumado a esto, es necesaria la migración de componentes sinápticos y la maduración de la sinapsis. Esta organización es la que promueve la formación de la hendidura sináptica favoreciendo el contacto entre la célula pre y post sináptica (Harris and Weinberg, 2012). Al formarse estas uniones es cuando la actividad sináptica puede establecerse, ya sea por la transmisión de potenciales de acción o por la liberación de neurotransmisores desde la pre hasta la post sinapsis. Las hendiduras sinápticas se caracterizan por tener una estrecha proximidad entre las proteínas pre y post sinápticas lo que permite determinar la colocalización entre proteínas de un lado y del otro de la hendidura por microscopía confocal (Ippolito and Eroglu, 2010). En un trabajo reciente de nuestro laboratorio demostramos que M6a endógena participa de las sinapsis. Sumado a esto, la sobreexpresión de M6a aumenta el número de acúmulos de sinaptofisina, de acúmulos de NMDA-R1 y de sinapsis (Formoso, y col., 2016). Más aún, tanto la disminución de la expresión de M6a (por iARN), como la presencia de nsSNPs en regiones codificantes del TM2 o mutaciones de dos cisteínas presentes en el EC2 disminuyen la cantidad

de sinapsis por unidad de dendrita (Alfonso, y col., 2005a, Fuchsova, y col., 2009, Formoso, y col., 2016).

Habiendo determinado que M6a se endocita y luego del WO_{4h} se localiza en la membrana plasmática de neuronas sometidas al AIA nos preguntamos si esto tenía efectos funcionales. A continuación, estudiamos si la endocitosis y el posible reciclado de M6a modifican el número de sinapsis de neuronas. En este contexto, evaluamos el número de clústeres de sinaptofisina en dendritas de neuronas de 15 DIV expuestas al AIA. En la Figura 8 se muestran imágenes representativas obtenidas por microscopía confocal de cada condición evaluada (T0, T1 y WO_{4h}).

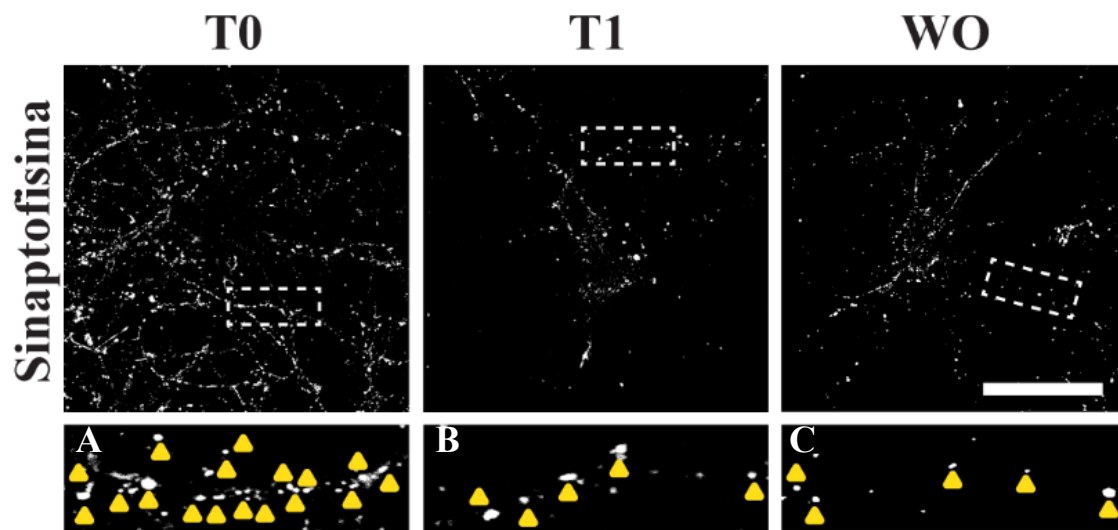


Figura 8: La endocitosis de M6a mediada por el anti-M6a-mAb disminuye la inmunomarcación de sinaptofisina. Imágenes representativas obtenidas por microscopía confocal de neuronas de 15 DIV sometidas al AIA. Se muestra la distribución de sinaptofisina con anti-sinaptofisina (anti-sin) hecho en conejo (1:200) y su correspondiente ampliación de 25x10 µm. Los clústeres se señalizan con un triángulo amarillo. Para la determinación de los clústeres se utilizó el *plugin Puncta Analyzer* del procesador de imágenes FIJI. Barra de escala: 15 µm.

Se puede observar la inmunomarcación de sinaptofisina en color gris tanto de las neuronas completas como de un fragmento representativo de 25x10 µm de dendrita para cada condición. La cuantificación de los clústeres de sinaptofisina fue hecha con el *software* de procesamiento de imágenes FIJI (ImageJ2) (Schindelin, y col., 2012) con el *plugin Puncta Analyzer*. Los triángulos amarillos representan los clústeres determinados por el *plugin*. En la ampliación de T1 (Figura 8B) se puede distinguir la disminución cualitativa de los clústeres de sinaptofisina comparados con T0 (Figura 8A). Además, el número de clústeres detectados en el WO_{4h} (Figura 8C) son comparables a lo observado en neuronas a T1. En la Figura 9 se muestra la cuantificación de los clústeres para cada condición ensayada a partir de fragmentos de 25 µm de dendrita. La internalización de M6a provoca la disminución significativa ($p < 0,001$) del

número promedio de clústeres de sinaptofisina por unidad de dendrita (T1) comparado con neuronas a T0. Si bien, cuatro horas de WO fueron suficientes para restablecer la localización de M6a en la superficie neuronal (Figura 7A), no fueron suficientes para restablecer el número de clústeres de sinaptofisina. Es decir, no hay diferencias significativas ($p > 0,05$) entre el número de clústeres a T1 comparados con WO_{4h}.

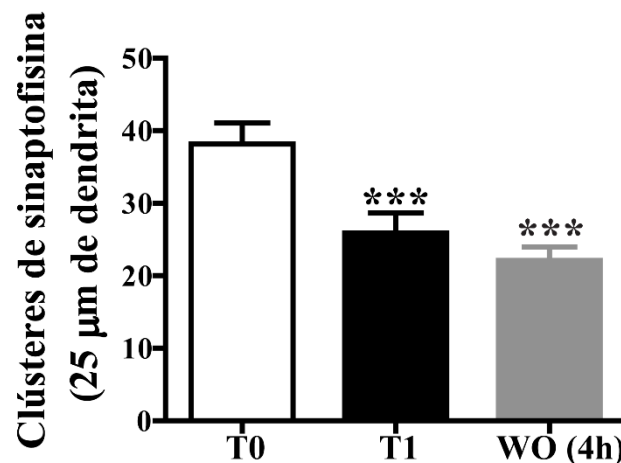


Figura 9: El tratamiento con el anti-M6a-mAb disminuye significativamente el número de clústeres de sinaptofisina. Cuantificación de los clústeres de sinaptofisina de cada condición evaluada (T0, T1 y WO_{4h}). Los clústeres fueron determinados con el *plugin Puncta Analyzer* del *software FIJI*. Los resultados están expresados como la media + el error estándar de la media (SEM). Las diferencias significativas fueron determinadas con el test ANOVA de un factor seguido de la prueba de Bonferroni. $F(2,77)=12,07$, $p=0,205$; ***, $p < 0,001$ T0 vs. T1 ($n=27$) y ***, $p < 0,001$ T0 vs. WO_{4h} ($n=32$).

Dado que M6a recupera su localización subcelular a las 4 horas post inmunointernalización, pero no su funcionalidad, extendimos el ensayo a un período de WO a 20 horas. Para ello se utilizaron neuronas sometidas a AIA como se explicó en la Figura 7. Con el WO_{20h} obtuvimos resultados similares que con el WO_{4h}. Como se muestra en la Figura 10, en las imágenes correspondientes a T0 se observa que la distribución de M6a endógena se encuentra restringida a la superficie neuronal. También, el perfil RGB muestra una coincidencia completa en los picos de intensidades de fluorescencia verde y magenta. En las imágenes correspondientes a T1 se pueden observar acúmulos de M6a verdes exclusivamente. Esto se ve reflejado en el perfil RGB donde se observan picos de intensidad de fluorescencia verde que no coinciden con el magenta. Por el contrario, y de forma similar al WO_{4h}, se puede observar en las imágenes correspondientes al WO_{20h} que la distribución de M6a se limita a la membrana neuronal.

A continuación, estudiamos si el WO_{20h} era suficiente para reestablecer el número de sinapsis. En este caso cuantificamos el número de clústeres de sinaptofisina (proteína pre sináptica) y del receptor de glutamato NMDA-R1 (proteína post sináptica). Además,

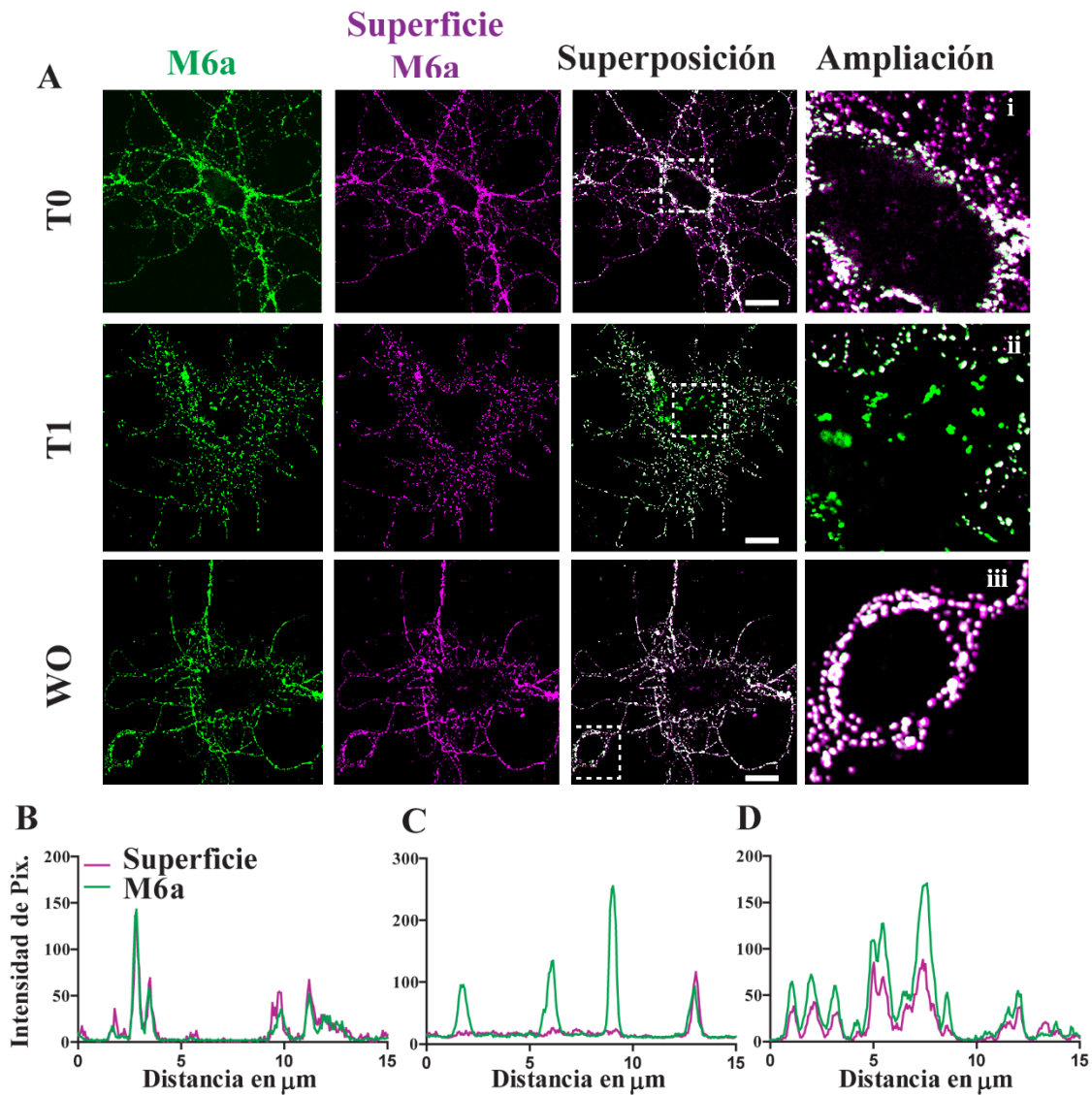


Figura 10: *M6a se endocita y luego del $\text{WO}_{20\text{h}}$ se localiza en la membrana neuronal.* **A.** Imágenes representativas obtenidas por microscopía confocal de neuronas de 15 DIV sometidas al AIA. M6a total fue marcada con el anticuerpo secundario conjugado a Alexa 488 (se muestra en verde) y la porción de M6a remanente en superficie fue marcada con un anticuerpo terciario acoplado a Alexa 568 (se muestra en magenta). Todas las inmunomarcaciones fueron realizadas previamente a la fijación. La superposición de los canales se muestra en blanco. Barra de escala: 15 μm . Ampliación 25x25 μm . **B-D.** Se generaron perfiles RGB como se explica en la Figura 5. Se trazó una línea recta de 15 μm de longitud dentro del área recuadrada con línea de puntos: T0 (i), T1 (ii) y $\text{WO}_{20\text{h}}$ (iii). Obtuvimos los valores de intensidad de fluorescencia de ambos canales para cada pixel y eso lo representamos en función de la distancia en micrómetros.

cuantificamos el número de sinapsis como la colocación entre los clústeres de sinaptofisina y los clústeres de NMDA-R1 como se ha reportado en bibliografía. De forma similar a lo realizado en un trabajo previo del laboratorio (Formoso, y col., 2016) fijamos las neuronas que habían sido sometidas al AIA con una solución con metanol (según las recomendaciones de la empresa Synaptic System). En la puesta a punto determinamos que la detección de M6a y sinaptofisina no se veían alteradas con este protocolo de inmunofluorescencia. Como paso siguiente realizamos la inmunodetección de M6a endógena, sinaptofisina y NMDA-R1 en simultáneo luego del AIA.

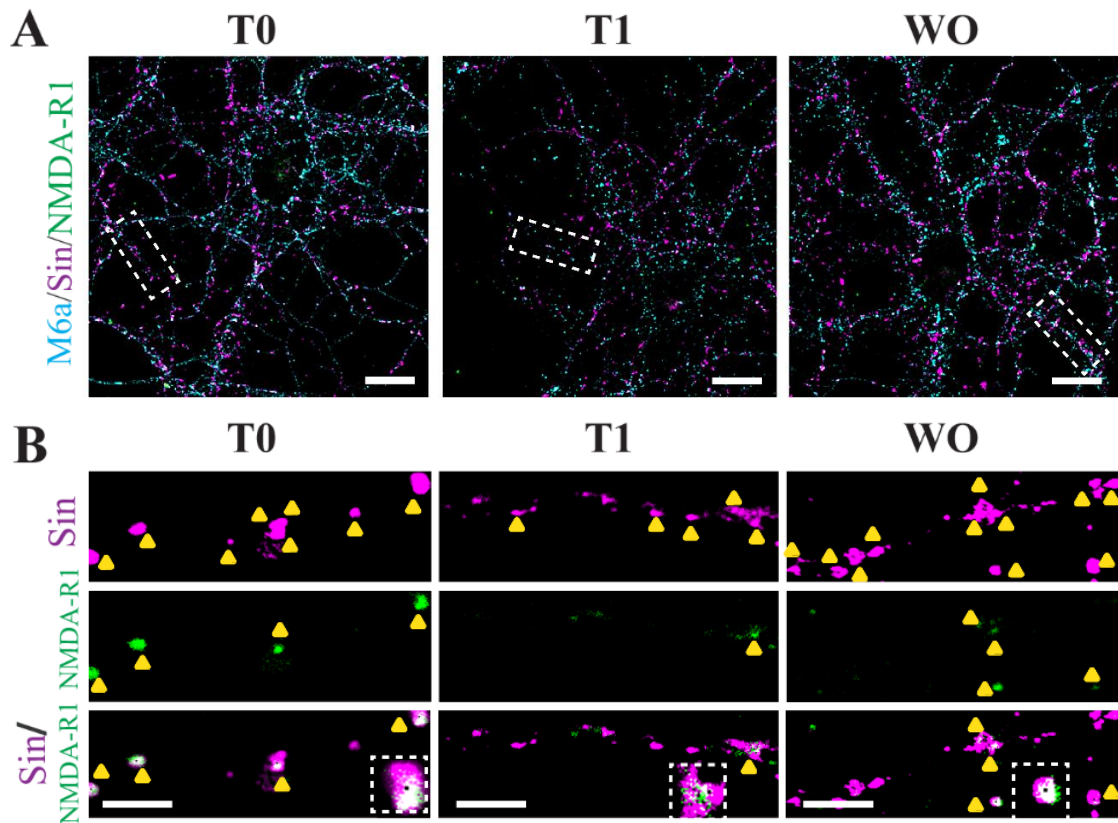


Figura 11: La internalización de M6a disminuye la marca de sinaptofisina y NMDA-R1 en neuronas de hipocampo. **A.** Imágenes representativas adquiridas por microscopía confocal de neuronas de 15 DIV sometidas al AIA en cada condición evaluada. M6a endógena se observa en cian, el marcador pre sináptico, sinaptofisina (sin) se observa en magenta y el marcador post sináptico, NMDA-R1 en verde. La escala es de 15 μm . **B.** Fragmentos representativos de dendritas de 25 μm de longitud (rectángulos punteados en A) de cada condición ensayada. Los triángulos amarillos representan los clústeres de cada marcador sináptico (sinaptofisina y NMDA-R1), y en el panel inferior los triángulos muestran las sinapsis detectadas por el plugin *Puncta Analyzer*. La escala: 5 μm . Ampliación 4x4 μm .

En la Figura 11A se muestran imágenes representativas adquiridas por microscopía confocal de neuronas de 15 DIV donde M6a endógena se observa en color cian, sinaptofisina en color magenta y NMDA-R1 en color verde para cada condición evaluada (T0, T1 y WO_{20h}). Utilizamos también el *Puncta Analyzer* del software FIJI para determinar el número de clústeres de sinaptofisina y NMDAR-1 y las sinapsis. En la Figura 11B se destacan fragmentos de 25x10 μm de dendrita en donde se marcan con triángulos amarillos los clústeres de sinaptofisina, los de NMDA-R1 y las sinapsis en el panel de superposición. En éste se destacó en línea punteada, para cada condición, una sinapsis en dónde se observa un pequeño cuadrado negro el cual representa el *output* arrojado por el *software*. De forma cualitativa se puede observar que en neuronas a T1 disminuyen tanto los clústeres de los marcadores sinápticos como las sinapsis comparados con neuronas a T0. Asimismo, en la condición WO_{20h} se observan clústeres comparables a los niveles de neuronas a T0. La cuantificación se puede ver en la Figura 12, donde determinamos que la internalización de M6a a T1 exhibe una disminución significativa

del número de clústeres tanto de sinaptofisina ($p < 0,05$) como de NMDA-R1 ($p < 0,001$) comparado con neuronas a T0. Asimismo, neuronas sometidas al WO_{20h} reestablecen el número de clústeres de ambos marcadores sinápticos con valores comparables con los de T0 (sin $p < 0,01$; NMDA-R1 $p < 0,05$). En cuanto al número de sinapsis, también observamos que la internalización de M6a en neuronas a T1 exhiben una disminución significativa al compararlas con neuronas a T0 ($p < 0,001$). De igual modo, la cantidad de sinapsis se vio reestablecida luego del WO_{20h}, siendo los valores similares a los de neuronas en estado estacionario (T0). La consecuencia concomitante de la endocitosis de M6a (T1) es la reducción del número de sinapsis. Además, las neuronas sometidas a un WO_{20h} reestablecen el número de sinapsis a valores comparables con neuronas en estado estacionario.

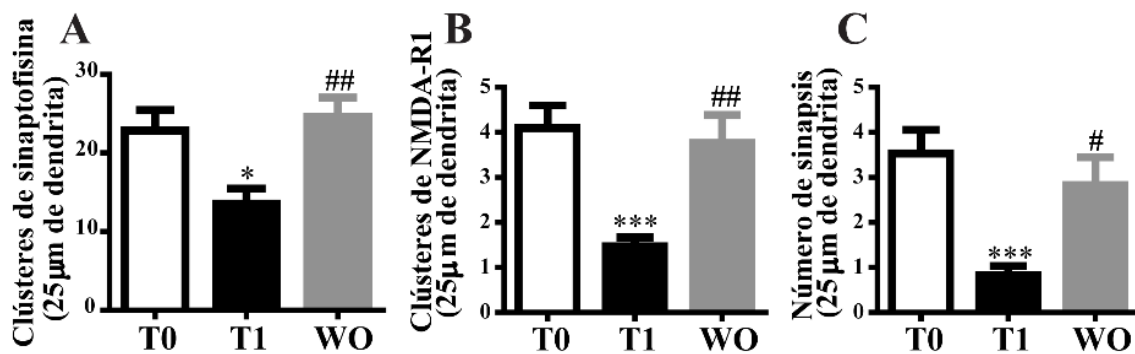


Figura 12: La internalización de M6a provoca la disminución de las sinapsis que se ve revertida con el WO_{20h}. A-B. Cuantificaciones de los clústeres de sinaptofisina y NMDA-R1 respectivamente. C. Cuantificación de las sinapsis a lo largo de 25 μm de dendrita. Los gráficos muestran un experimento representativo en donde se analizaron 10-15 neuronas con 3 fragmentos por neurona por condición. Estos resultados se obtuvieron en al menos tres experimentos independientes. Los resultados están expresados como la media + SEM. Las diferencias significativas fueron determinadas con el test de ANOVA de un factor seguido de la prueba de Bonferroni. Clústeres de sinaptofisina: F (2,87)=6,38, $p=0,1897$; *, $p < 0,05$, T0 vs. T1 (n=30); ##, $p < 0,001$, T1 vs. WO_{20h} (n=30). Clústeres de NMDA-R1: F(2,87)=9,22; ***, $p < 0,001$, T0 vs. T1 (n=30); ##, $p < 0,001$, T1 vs. WO_{20h} (n=30). Sinapsis: F(2,87)=8,51, $p < 0,0001$. ***, $p < 0,001$, T0 vs. T1 (n=30); #, $p < 0,05$, T1 vs. WO_{20h} (n=30).

El nivel de expresión de las proteínas sinápticas, sinaptofisina y NMDA-R1, no se modifica con el AIA.

Teniendo en cuenta que la endocitosis de M6a está acompañada por la disminución del número de clústeres de los marcadores sinápticos y de sinapsis, nos preguntamos si ésto podría estar relacionado con sus niveles de expresión proteica. Para ello, sembramos 1×10^6 neuronas en placas de cultivo y las cultivamos durante 15 días. Estas fueron sometidas al AIA, se obtuvieron las proteínas totales y se realizó *Western blot*. Realizamos la cuantificación de la abundancia de proteínas por la técnica de Bradford para cada condición evaluada. Por electroforesis en SDS-PAGE se separaron cantidades similares de proteínas de cada condición.

Estas proteínas fueron transferidas hacia membranas de nitrocelulosa seguido de la inmunodetección por el anticuerpo policlonal que reconoce a sinaptofisina, anti-sin, hecho en conejo que detecta una banda única de aproximadamente 42 kDa. Para la detección de NMDA-R1 utilizamos un anticuerpo monoclonal, anti-NMDA-R1, que reconoce a la sub-unidad R1 (GluN1) de aproximadamente 110 kDa. Como control de carga utilizamos anti-alfa tubulina hecho en ratón con un peso molecular de 50 kDa. Utilizamos tubulina ya que no cambia su expresión en las diferentes condiciones ensayadas asumiendo una expresión linealmente dependiente a la cantidad de proteínas totales. Para determinar la movilidad electroforética y peso molecular aparente de las proteínas de interés utilizamos un marcador de peso molecular de 10-170 kDa.

Como se observa en la Figura 13, los resultados de la inmunodetección específica de cada marcador sináptico, sinaptofisina y NMDA-R1, no mostraron diferencias en las distintas condiciones experimentales ensayadas. Estos resultados nos permiten especular que M6a es requerida en la superficie celular para la formación y el mantenimiento de las sinapsis. Sumado a esto, la disminución de los clústeres tanto de sinaptofisina como de NMDA-R1 no sería debido a su degradación. A partir de estos resultados creemos que la disminución en el número de clústeres observada podría deberse a la deslocalización de las proteínas sinápticas.

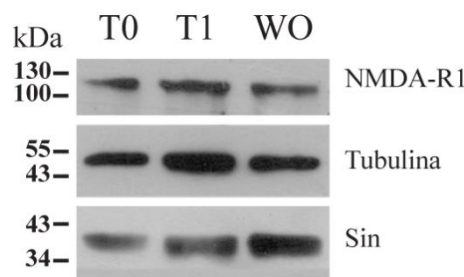


Figura 13: *La abundancia de las proteínas sinápticas no varía en neuronas de hipocampo sometidas al AIA.* Se sometieron a cultivos celulares de neuronas de 15 DIV al AIA y se extrajeron las proteínas totales. Iguales cantidades de proteínas totales fueron separadas por SDS-PAGE seguido de *Western blot* con anti-sinaptofisina (sin, 1:1000), anti-NMDA-R1 (1:500) y anti-alfa tubulina (1:2000). A la izquierda se muestran los estándares de peso molecular. Para cada una de las proteínas ensayadas se visualizó una única banda del peso molecular esperado.

El porcentaje de M6a en la superficie celular disminuye luego de una hora en presencia del anti-M6a-mAb.

A los fines de realizar un análisis cuantitativo del porcentaje de M6a en la superficie luego del AIA utilizamos citometría de flujo. Esta técnica nos permitió evaluar un gran número de eventos (células) por condición. Para cada condición evaluamos entre 10.000-50.000 eventos y medimos parámetros morfológicos y la fluorescencia. Sumado a esto, la adquisición de datos

con el citómetro de flujo es muy rápida comparado con la toma de imágenes por microscopía. Por lo tanto, el análisis cuantitativo es más sencillo y mejoran los parámetros estadísticos.

Realizamos el ensayo como se muestra en el esquema de la Figura 14. Brevemente, las neuronas fueron expuestas al anti-M6a-mAb o al control de isotipo durante 45 minutos a 4°C. El control de isotipo es un anticuerpo del mismo isotipo, o porción constante, que el anti-M6a-mAb (IgG2aκ) pero que reconoce un epítipo no relacionado con mamíferos. Este

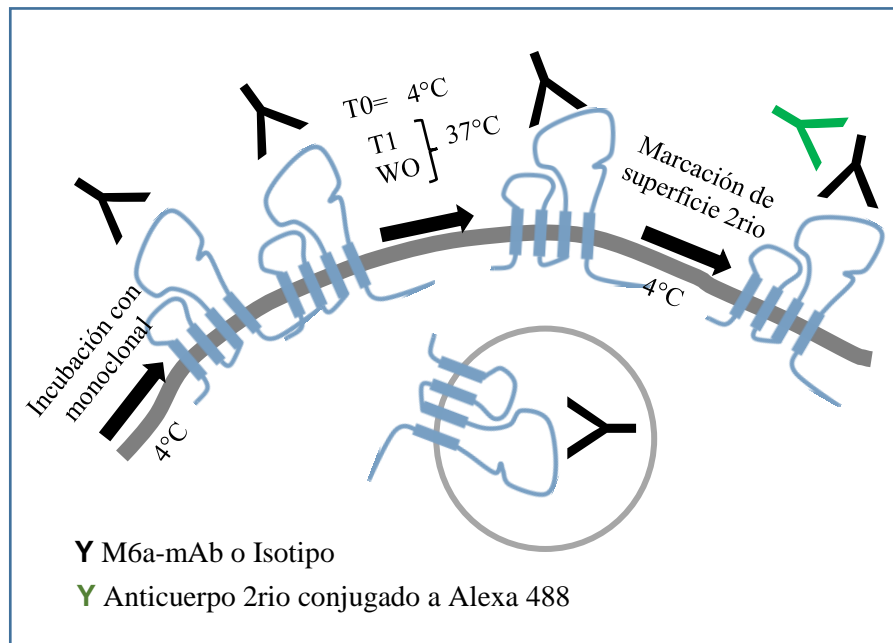


Figura 14: *Esquema de inmunointernalización de M6a mediado por el anti-M6a-mAb*. Las neuronas fueron expuestas al anti-M6a-mAb o al isotipo (también monoclonal) durante 30-45 minutos a 4°C. Posteriormente, el medio fue reemplazado y las células fueron incubadas a 4°C o a 37°C durante 1 hora para bloquear o permitir la endocitosis respectivamente. En el caso del WO, se les cambió el medio y se las incubó durante 4 o 20 horas a 37°C. Luego se detectó a M6a remanente en la superficie con un anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo (verde).

control nos indicará la interacción inespecífica del isotipo con las células. A diferencia del AIA realizado para la Figura 7, en este caso marcamos a M6a en la superficie con un anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo verde. A T0 realizamos la marcación de M6a total en la membrana plasmática. En cambio, para las células incubadas a 37°C (T1), realizamos la marcación de M6a residual en la superficie celular, ya que permitimos la endocitosis. Como paso siguiente resuspendimos las neuronas de forma mecánica, con *scraper*, y las acondicionamos para citometría de flujo.

Para el análisis por citometría de flujo es necesario ajustar parámetros del equipo y mantenerlos constantes para todas las condiciones evaluadas. Estos parámetros fueron: las escalas, la intensidad del láser azul (canal FL1) y las ganancias de las intensidades de fluorescencia. Estos ajustes permitieron distinguir poblaciones celulares e incluso no incluir en

la adquisición de datos los detritus celulares. En la Figura 15 se muestra un gráfico de *dot plot* que representa a los eventos (neuronas sin marcar) en función de los ejes de *forward*

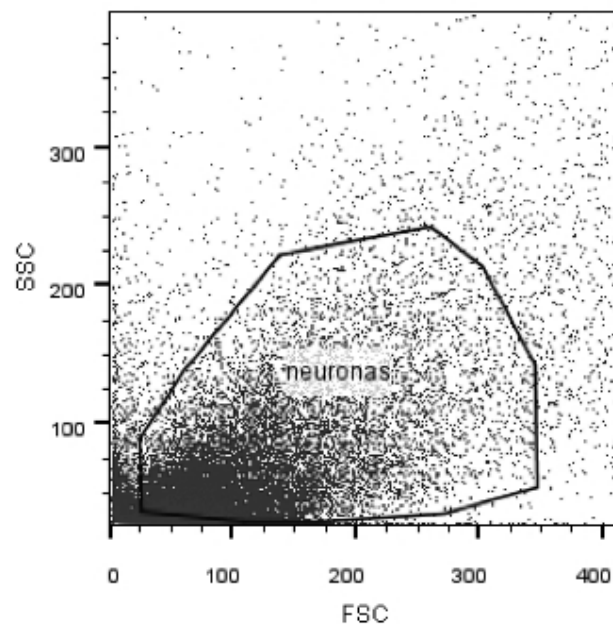


Figura 15: Gráfico de *dot plot* obtenido por citometría de flujo de neuronas de 5 DIV. En el gráfico se observa la representación de *dot plot* de neuronas sin marcación. A partir de este gráfico se determinó la región correspondiente a las neuronas excluyendo los detritus celulares y los datos dispersos. Los parámetros representados son *forward scatter* (FSC), que da noción del tamaño celular, y *side scatter* (SSC), que da noción de la complejidad de las células.

scatter, que da noción del tamaño celular, y *side scatter*, que da noción de la complejidad intracelular. Se puede distinguir en el gráfico una nube de eventos cercana a los ejes que corresponde a la población de neuronas. Por lo tanto, se determinó una región de interés que engloba a éstos eventos (señalada en el gráfico con una línea negra) con la que se realizaron los análisis posteriores. A partir de estos datos se realizaron los histogramas de los eventos (neuronas) en función de la intensidad de fluorescencia adquirida en el canal FL1 (verde).

En la Figura 16 se pueden observar los histogramas superpuestos correspondientes a neuronas tratadas con el control de isotipo (gris oscuro) a T0 (gris) y a T1 (negro). Elegimos el punto de corte de fluorescencia, que no superó el 5 % de la fluorescencia total, en base a la interacción inespecífica del isotipo con las neuronas. Esto nos permitió distinguir la población positiva (verdes) de la negativa (interacción inespecífica). A partir de ese punto de corte determinamos los porcentajes de las demás condiciones experimentales. Se puede observar que no hay diferencias apreciables en el porcentaje de M6a en la superficie entre neuronas a

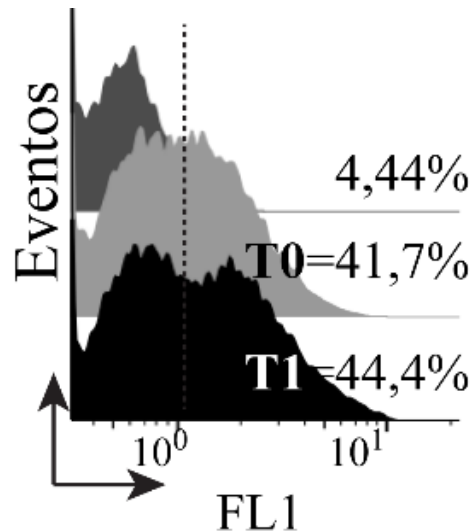


Figura 16: *Histogramas representativos de intensidad de fluorescencia verde obtenidos por citometría de flujo de neuronas de 5 DIV.* Se observa la intensidad de fluorescencia en el canal FL1 (verde) en función de los eventos (neuronas). M6a en superficie fue detectada con un anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488 (1:1000, verde). En gris se representa a neuronas tratadas con el isotipo (incubadas 1 hora a 4°C, con estas se determinó el punto de corte <5 %), en gris claro se representa al T0 (incubadas 1 hora a 4°C) y en negro al T1 (incubadas 1 hora a 37°C).

T0 y T1. Estos resultados indican que el sistema no es sensible a los cambios en el porcentaje de M6a en la superficie luego del AIA. Es por ello que decidimos utilizar un sistema donde la concentración de M6a en la superficie es menor. Reportes del laboratorio evidencian que la concentración de M6a en la superficie neuronal aumenta durante la diferenciación neuronal *in vitro* entre 1 DIV-15 DIV (Formoso, y col., 2016). Por ello, utilizamos neuronas de 1-2 DIV con el objetivo de obtener mayor resolución en los cambios de M6a en la membrana y evaluamos las diferencias entre la cantidad de M6a en la membrana neuronal a T0, T1 y WO_{20h}. Para esto sembramos neuronas de hipocampo en placas acondicionadas en medio con suero durante dos horas. Al momento del cambio de medio comenzamos con el AIA de igual forma que fue descripto para neuronas de 5 DIV (Figura 14). Brevemente, expusimos a las neuronas al anti-M6a-mAb o al control de isotipo durante 45 minutos a 4°C. Luego reemplazamos el medio por medio fresco y las neuronas se mantuvieron a 4°C durante una hora (T0), o fueron cultivadas a 37°C durante una hora (T1) o durante veinte horas (WO_{20h}). El control de isotipo se trató de igual forma que neuronas a T1. En este punto, debimos considerar la cantidad de M6a a 2 DIV como T0_{2DIV} para relativizar los valores del WO_{20h}. Luego del periodo de 20 horas expusimos a las neuronas al anticuerpo neutralizante en frío seguido del anticuerpo secundario verde (anti-rata Alexa 488 1:500). Realizamos la resuspensión mecánica de las neuronas con *scraper* y se las acondicionó para citometría de flujo.

En la Figura 17 se muestran los histogramas de un ensayo representativo que muestra los

eventos (neuronas) en función de las intensidades de fluorescencia en FL1 (fluorescencia verde). Determinamos el punto de corte para distinguir la población positiva de la negativa de igual forma que para neuronas de 5 DIV. Se puede observar que hay una reducción en el porcentaje de M6a en la superficie a T1 comparado con T0. También se observa el aumento de M6a en la membrana luego del WO_{20h}. En la Figura 18 se puede observar el gráfico de barras que representa a tres experimentos independientes. Los datos fueron normalizados con sus respectivos controles. A T1 se observa una disminución significativa ($p < 0,001$) del porcentaje de M6a en la superficie neuronal (~65 %) comparado con su control (T0=100 %). En contraste, las neuronas que fueron sometidas al WO_{20h} tienen alrededor del 80% de M6a en la superficie neuronal comparado con su control (T0_{20h}=100 %). Estos resultados indican que fuimos capaces de distinguir distintas concentraciones de M6a en membrana en las condiciones evaluadas. Mediante la utilización de neuronas de 1-2 DIV pudimos describir que hay una reducción del porcentaje de M6a en la membrana a T1 y que luego del WO_{20h} en parte se reestablece.

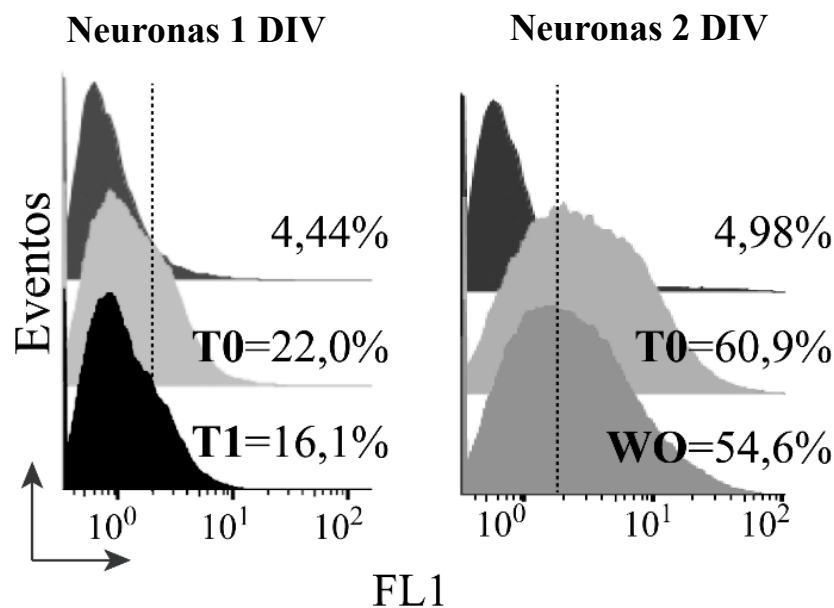


Figura 17: *M6a se endocita y posiblemente se recicla en neuronas de hipocampo 1/2 DIV evaluados por citometría de flujo.* Histogramas representativos de la intensidad de fluorescencia verde (FL1) en función del número de eventos. Los eventos representan a neuronas sometidas al AIA. M6a en superficie fue detectada con un anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488 (1:500, verde). En gris oscuro se representa a neuronas tratadas con el isotipo (incubado 1h a 37°C), en gris claro a T0 (incubadas 1h a 4°C), en negro a T1 (incubadas 1h a 37°C) y en gris intermedio al WO_{20h} (incubadas 20 h a 37°C).

Además, controlamos si el procedimiento, el AIA seguido de la resuspensión mecánica con *scraper*, producen daño a las neuronas. Para evaluar la integridad celular utilizamos tanto la microscopia de fluorescencia como la citometría de flujo. Es decir, colocamos una alícuota de la muestra de neuronas acondicionadas para citometría de flujo en una cámara de Neubauer y observamos por un lado la morfología celular y por otro la fluorescencia verde que emitían

las neuronas inmunomarcadas. Observamos que la mayoría de las células se encontraban íntegras independientemente de la condición evaluada (células sin marcar, isotipo, T0, T1, WO) (datos no mostrados).

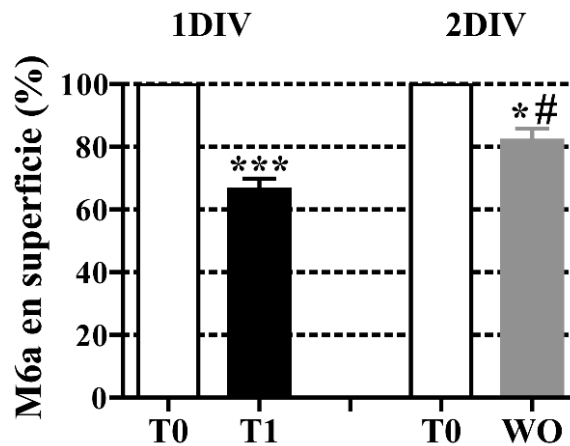


Figura 18: *M6a* endógena en neuronas de hipocampo maduras se endocita a T1 y luego del WO_{20h} se ubica en la membrana. Cuantificación de tres experimentos independientes representados como el porcentaje de M6a en superficie relativizado a su respectivo T0. Los resultados están expresados como la media + SEM. La barra blanca representa a T0_{1DIV} o T0_{2DIV}, la barra negra representa a T1 y la barra gris al WO_{20h}. Las diferencias significativas fueron determinadas con el test ANOVA de un factor seguido de la prueba de Bonferroni. $F(3,8)=38,26$, $p<0,001$, $n=3$; ***, $p<0,001$ entre T0 vs. T1; */#, $p<0,05$ T0 vs. WO_{20h} y T1 vs. WO_{20h}.

En paralelo, realizamos una marcación vital con el reactivo 7-aminoactinomicina D (7-AAD) que es capaz de unirse al ADN. Esto ocurre en el caso de que la permeabilidad de la membrana plasmática se encuentre alterada. Esta alteración se da en células que entran en apoptosis o en células rotas lo que le permite al reactivo ingresar. Por este motivo se realizó en células sin fijar. Este compuesto puede ser excitado con el láser azul del citómetro de flujo y su detección es óptima en el pico de 647 nm (canal FL3). A modo de control utilizamos neuronas que fueron expuestas al control de isotipo que se observa en el histograma de color gris. A T0 detectamos que había un 2,93 % de neuronas 7-AAD positivas. De forma similar a T1 el porcentaje fue de 2,87 % como se puede observar en los histogramas de la Figura 19. Este resultado indica que el porcentaje de células permeables al reactivo 7-AAD es similar para todas las condiciones evaluadas. Resumiendo, no detectamos diferencias tanto en la observación de las células al microscopio como en la incorporación del colorante vital en ninguna de las condiciones evaluadas.

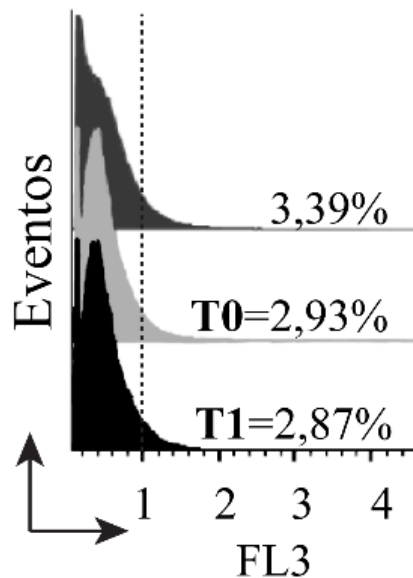


Figura 19: *Incorporación del colorante vital 7-AAD en neuronas luego de ensayarlas por el AIA.* Histogramas representativos de la intensidad de fluorescencia roja (FL3) en función del número de eventos. Los eventos representan a neuronas sometidas al AIA y expuestas al 7-AAD. El histograma gris representa neuronas tratadas con el isotipo. Se observa cantidades comparables de incorporación del colorante vital.

En conjunto los resultados de esta parte muestran que el tratamiento con el anti-M6a-mAb induce la endocitosis de M6a de la superficie neuronal. Con ensayos de microscopia confocal determinamos que M6a endógena luego de una hora de estímulo neutralizante se encuentra en el interior celular. Sin embargo, luego del WO (4 o 20 horas) observamos que M6a se restringe a la membrana plasmática. Acompañando a estos resultados, determinamos por citometría de flujo que el porcentaje de M6a en la membrana neuronal disminuye significativamente en neuronas a T1. La endocitosis de M6a se encuentra acompañada por la disminución de la cantidad de sinapsis por unidad de dendrita. En este contexto, especulamos que la disminución del número de clústeres sinápticos no estaría asociado a modificaciones en la cantidad de proteínas pre y post sinápticas sino a su deslocalización en la hendidura sináptica. Esto último señala un rol esencial del sistema de endocitosis de M6a en la formación y mantenimiento de las sinapsis.

La endocitosis de M6a es dependiente de vesículas revestidas por clatrina.

Las vías endocíticas en las células eucariotas son muy variadas, tal como se expuso en la introducción. La EMC involucra múltiples pasos que incluyen la formación, estabilización y maduración de los endosomas revestidos por clatrina. Este proceso esta orquestado por un conjunto de proteínas adaptadoras y efectores que participan en este tipo de endocitosis (Merrifield and Kaksonen, 2014). La endocitosis independiente de clatrina EIC engloba a la

endocitosis mediada por caveolina y a la *bulk* endocitosis entre otros. En particular la endocitosis mediada por caveolina se caracteriza por internalizar moléculas presentes en microdominios de membrana altamente organizados denominados *lipid rafts*. A través de este tipo de endocitosis se forman endosomas revestidos de caveolina o caveosomas (Figura 3 y 5) (Maxfield and McGraw, 2004, Mayor and Pagano, 2007).

En esta sección nos centramos en el estudio de la vía de endocitosis en neuronas hipocámpales y la línea celular HEK293 que sobreexpresaban M6a fusionada a una proteína fluorescente (GFP o RFP). La sobreexpresión de M6a-GFP/RFP nos permitió hacer el seguimiento de la proteína y de esta manera estudiarla. La células HEK293, que no expresan M6a endógena, es una línea celular ampliamente utilizada para este tipo de estudios (Wu, y col., 2007, Liang, y col., 2008, Conti, y col., 2009).

Con el propósito de validar el sistema, en primer lugar, evaluamos la endocitosis y reciclado de M6a sobreexpresada fusionada a una proteína fluorescente (RFP/GFP) en neuronas de hipocampo maduras. Estas neuronas, de 15 DIV, las transfectamos de forma transitoria con M6a-RFP/GFP y las sometimos al AIA según se explicó anteriormente en la Figura 6. En la Figura 20 se observan imágenes representativas obtenidas por microscopía confocal en donde se observa a M6a total (M6a-RFP) en color verde y a M6a en la superficie magenta. La superposición de ambos canales se observa de color blanco en el tercer panel. A T0, de manera similar a lo observado para M6a endógena en la Figura 7, se visualiza una superposición casi completa de M6a-RFP con la fracción de M6a en la membrana celular. Acompaña a esta observación el perfil RGB en donde se puede apreciar la coincidencia completa de las intensidades de fluorescencia en cada pixel. En cambio, en células a T1 se puede observar la presencia de endosomas que contienen a M6a en el soma neuronal. Esto es evidente en el panel de superposición en donde se muestran partículas que son sólo verdes y no coinciden con el magenta. En el perfil RGB se visualizan picos de intensidad de fluorescencia verde que no coinciden con el magenta. Esto último indicaría que M6a fue endocitada y se encuentra en el citoplasma neuronal. En las células sometidas al WO_{4h} (que fue tratado con cicloheximida para prevenir la síntesis de nuevas proteínas) se observa a M6a en la superficie neuronal. Esto provocó la superposición total entre M6a-RFP sobreexpresada y la marcación de M6a en la membrana. El perfil RGB del WO evidencia, como a T0, la superposición completa de las intensidades de fluorescencia de ambos canales. Estos resultados sugieren que M6a-RFP sobreexpresada podría ser reciclada a la membrana plasmática luego de que es endocitada.

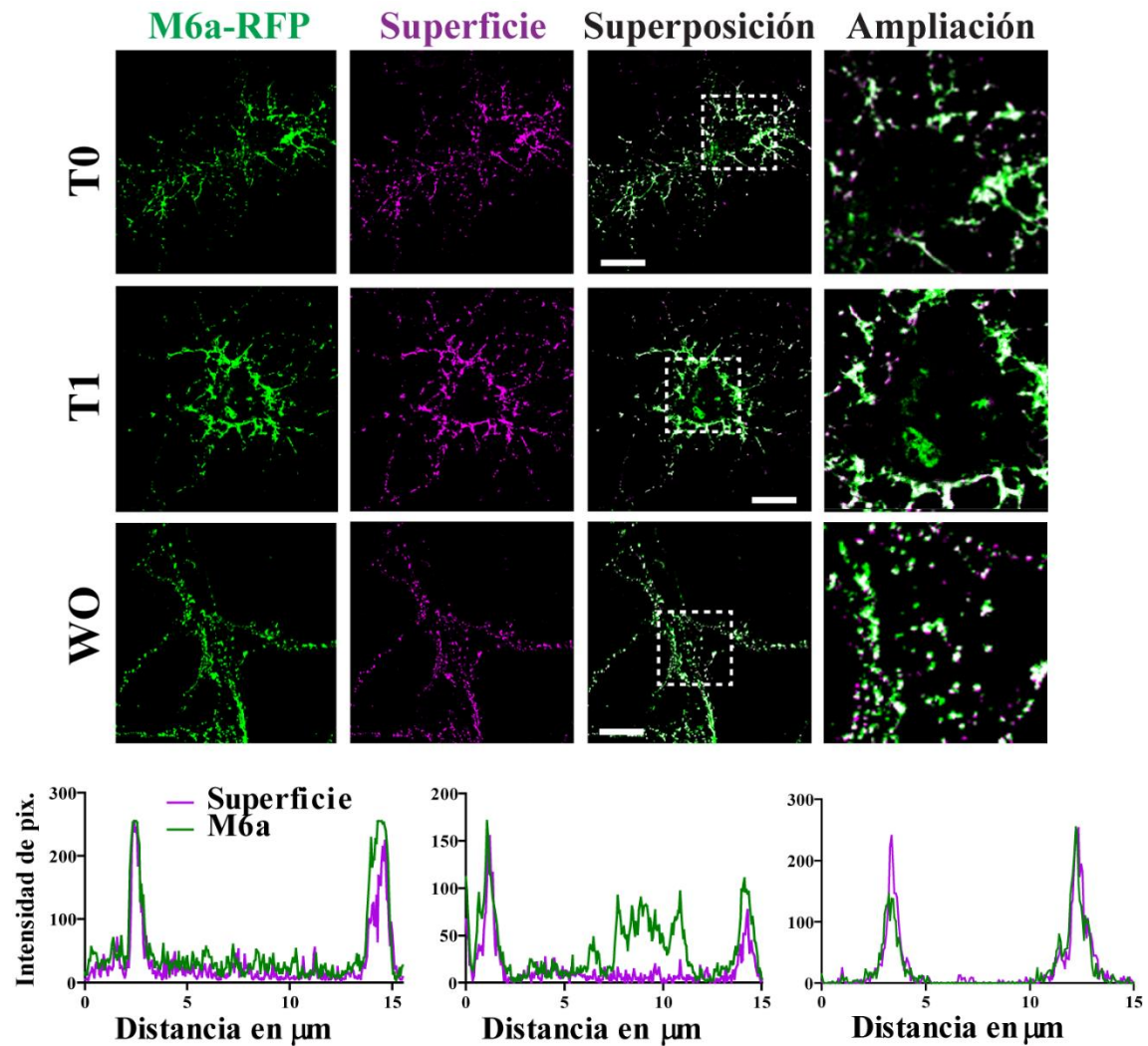


Figura 20: *M6a-GFP se endocita en neuronas hipocámpicas luego de una hora de tratamiento neutralizante.* Imágenes representativas de cada condición experimental. Éstas fueron obtenidas por microscopía confocal a partir de neuronas de hipocampo de 15 DIV que sobreexpresaban M6a-RFP (se muestra en verde) y fueron sometidas al AIA en presencia de cicloheximida. Para marcar M6a remanente en superficie luego del AIA se utilizó un anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo (anti-rata-Alexa488) que se muestra en magenta. En el caso de haber superposición de las marcas fluorescentes esto se visualiza en blanco en la tercera columna. En la parte inferior se observan los perfiles RGB generados a partir de una línea de 15 µm de longitud trazada dentro del cuadrado punteado (obtenidas de igual forma que en la Figura 11). Escala 15 µm. Ampliación 10x10 µm.

En paralelo y en forma transitoria transfectamos células HEK293 con el plásmido M6a-RFP y las sometimos al AIA. Como se muestra en la Figura 21, de forma similar a lo ocurrido en las neuronas que sobreexpresan M6a, a T0 observamos una superposición casi completa de M6a-RFP (que se muestra en verde) con la fracción de M6a de membrana (que se muestra en magenta). El perfil RGB muestra la superposición de las intensidades de fluorescencia de ambos canales. Más aún, al evaluar a T1 observamos partículas de M6a en el citoplasma. Estas partículas o endosomas no fueron reconocidos por el anticuerpo que detecta a M6a en la superficie celular como se evidencia en el perfil RGB. Es decir, se observó picos de intensidad de fluorescencia verde exclusivamente. Por el contrario, en el WO_{4h}, observamos a M6a

restringida a la superficie celular. Esto se evidencia en el perfil RGB en donde se vio la coincidencia de ambas curvas.

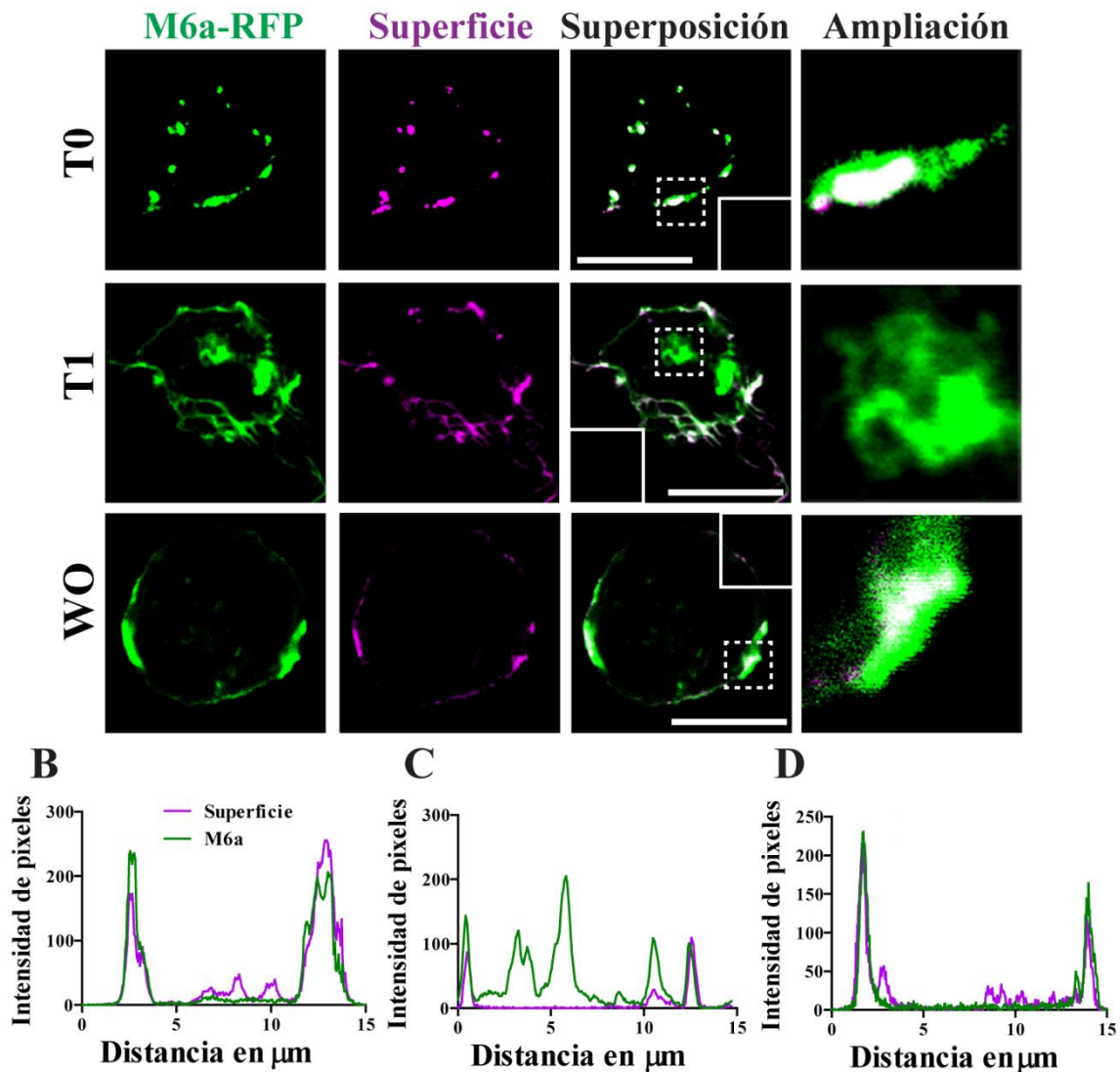


Figura 21: La sobreexpresión de M6a en la línea celular HEK293 no afecta su comportamiento endocítico. Imágenes representativas de cada condición experimental obtenidas por microscopía confocal. Éstas fueron obtenidas a partir de células HEK293 que sobreexpresaban M6a-RFP (se muestra en verde) y fueron sometidos al AIA en presencia de cicloheximida. **A** Para detectar M6a remanente en superficie se utilizó un anticuerpo secundario verde (anti-rata-Alexa488) que se muestra en magenta. En el caso de superposición entre ambas marcas, esta se visualiza en blanco en el panel de superposición. Escala 15 μm . Ampliación 4x4 μm . **B-D**. Perfiles RGB a lo largo de 15 μm de longitud para cada condición.

Como hemos mencionado, en bibliografía se utiliza a la línea celular HEK293 como modelo de endocitosis y reciclado (Wu, y col., 2007, Liang, y col., 2008, Conti, y col., 2009). Este modelo nos permitió cuantificar el porcentaje de M6a en la superficie celular, para las distintas condiciones del AIA, como ya se ha reportado para otras proteínas de membrana (Miserey-Lenkei, y col., 2001, Leterrier, y col., 2004). Para ello calculamos la intensidad de

fluorescencia total (FT), generando una región de interés o ROI que abarcaba toda la célula. Además, calculamos la intensidad de fluorescencia total en el citoplasma (FC), generando una ROI que abarcaba todo el citoplasma pero excluyendo la membrana. Para determinar la FT y FC tomamos el canal de M6a, en este caso el canal rojo (M6a-RFP). El porcentaje de M6a en la superficie lo calculamos como la razón entre FT y FC. Esta razón indica la proporción de M6a total que se encuentra en la superficie. Como se muestra en la Figura 22, este porcentaje lo graficamos en función de las condiciones experimentales (T0, T1 y WO). Observamos que a T0 el porcentaje de M6a en la superficie era aproximadamente el 80 % mientras que en

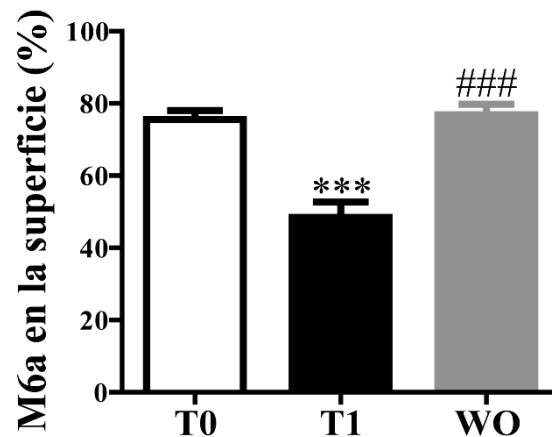


Figura 22: *Porcentaje de M6a en la superficie a partir de células HEK293.* A partir de imágenes obtenidas por microscopia confocal se determinaron dos regiones de interés (ROIs, por sus siglas en inglés) en células HEK293 que sobreexpresaban M6a-RFP. Una de ellas determinada por fuera de la membrana plasmática se calculó la fluorescencia total (FT). La otra fue determinada considerando todo el citoplasma excluyendo la membrana plasmática (FC). % de fluorescencia en superficie = $(FT/FC) \times 100$. La barra blanca representa a T0, la negra a T1 y la gris al WO_{4h}. Los resultados están expresados como la media + SEM. Las diferencias significativas fueron determinadas con el test de ANOVA de un factor seguido de la prueba de Bonferroni. $F(2,46)=21,04$, $p=0,0195$; ***, $p<0,001$ T0 vs. T1 ($n=20$). ####, $p<0,001$ T1 vs. WO_{4h} ($n=20$).

células a T1 hubo una reducción significativa ($p<0,001$), aproximadamente el 50 %. Por el contrario, en el WO_{4h} el porcentaje de M6a en la membrana es comparativamente similar a células en T0. Esta restitución de M6a a la membrana podría ser debida al reciclado de M6a hacia la superficie celular. Estos resultados son congruentes con los obtenidos por citometría de flujo (ver Figura 18). Anteriormente en ensayos de citometría de flujo describimos una reducción de M6a en la superficie a T1. También, determinamos que M6a recupera parcialmente su porcentaje en membrana con respecto al T0 luego del WO. De igual forma que ocurre en las neuronas de hipocampo, luego del WO, M6a se restringe a la membrana plasmática. Asimismo, la línea HEK293 nos permitió realizar las cuantificaciones de forma ágil.

M6a posee motivos lineales basados en tirosina susceptibles a la EMC.

Existen variados motivos lineales que se ubican en los extremos citoplasmáticos de las proteínas de membrana que nos permiten predecir su propio camino endocítico (Bonifacino and Dell'Angelica, 1999). Como aproximación utilizamos la base de datos disponible *on line*: *Eukaryotic Linear Motif* (ELM, <http://elm.eu.org/>) (Dinkel, y col., 2016). Colocamos la secuencia aminoacídica de M6a de rata (UniProtKB - Q812E9) como secuencia de búsqueda. Al realizar la evaluación de la secuencia de aminoácidos de M6a en la base de datos encontramos cuatro sitios predichos para la EMC que se resumen en la Tabla 1. Según la base

Motivos basados en tirosina en la secuencia aminoacídica de <i>Gpm6a</i> de rata.					
Dominio	Motivo	Posición	Nombre ELM	Descripción ELM	Compartimiento celular
EC1	YFEM	61-64	TRG-ENDOCITIC 2	Señal de interacción con la subunidad μ de la AP2 basado en tirosina	Membrana plasmática, citosol, vesículas endocíticas revestidas de clatrina
IC	YGDF	114-117	TRG-ENDOCITIC 2		
EC2	YMYF	153-156	TRG-ENDOCITIC 2		
C-terminal	YEDI	251-254	TRG-ENDOCITIC 2		

Tabla 1: *Motivos lineales presentes en la secuencia de aminoácidos de M6a: motivos basados en tirosina.* EC1: bucle extracelular menor, IC: dominio intracelular, EC2: bucle extracelular mayor, dominio C-terminal (UniProt KB-Q812E9). *Eukaryotic linear motif research database* (ELM2016).

de datos, se encuentran ubicados en el EC1, IC, EC2 y en el extremo C-terminal de M6a. Este último se encuentra ubicado hacia el citoplasma celular lo que le permitiría la interacción con AP-2 que es una molécula citoplasmática. El motivo $^{251}\text{YEDI}^{254}$ ubicado en el extremo citoplasmático C-terminal de M6a es un buen candidato para ser estudiado.

Como se muestra en la Figura 23, AP-2 es una proteína heterotetramérica formada por dos subunidades grandes α -2 y β -2 que tienen una región flexible. En uno de los extremos del brazo flexible poseen dominios globulares que contienen sitios de unión a clatrina. En el otro extremo, más voluminoso, tiene sitios de unión y ensamble para las subunidades pequeñas σ -2 y μ -2. Estas pequeñas subunidades son las responsables de reconocer e interactuar específicamente con los motivos consenso. En particular, los motivos lineales “basados en tirosina” son los que reconoce específicamente μ -2 tienen consensos como $\text{YXX}\Phi$ o $(\text{FY})\text{XNP}(\text{YF})$. En éstos motivos las “X” representan aminoácidos cuales quiera y el Φ representa un aminoácido con cadenas laterales voluminosas o hidrofóbicas. En este sentido, el motivo ubicado en el extremo C-terminal de M6a, $^{251}\text{YEDI}^{254}$, se ajusta a los requerimientos citados en bibliografía (Traub and Bonifacino, 2013). Mientras que σ -2 interactúa con motivos basados en dileucina (Bonifacino and Dell'Angelica, 1999). En concordancia con lo antes dicho, en nuestro laboratorio se ha probado que la cadena pesada de clatrina coimmunoprecipita con M6a. Esto

fue determinado por inmunoprecipitación de M6a con un anticuerpo que reconoce el C-terminal (anti-M6a C-terminal) a partir de homogenatos de hipocampo de rata e identificada por espectrometría de masas (Fuchsova, y col., 2015). Esto último propone a M6a como candidata a la EMC.

En contraposición, en nuestro laboratorio se ha descrito que una parte de M6a se encuentra en dominios altamente organizados denominados *lipid rafts* en la superficie neuronal, al igual que PLP, forma parte de estos dominios en la membrana de los oligodendrocitos (Winterstein, y col., 2008, Scorticati, y col., 2011). Asimismo, otros autores describieron que la participación de M6a en estos dominios de membrana es gracias a las palmitoilaciones en sus extremos citoplasmáticos que le permiten anclarse a ella (Honda, y col., 2017a, Ito, y col., 2018). Estos antecedentes proponen como vía de endocitosis de M6a a la EIC, dependiente de caveolina, ya que se encuentra en *lipid rafts*. Por el contrario, en esta sección hemos descrito por búsquedas *in silico* que M6a posee en su extremo C-terminal un motivo basado en tirosina que la hacen susceptible de ser endocitada por EMC.

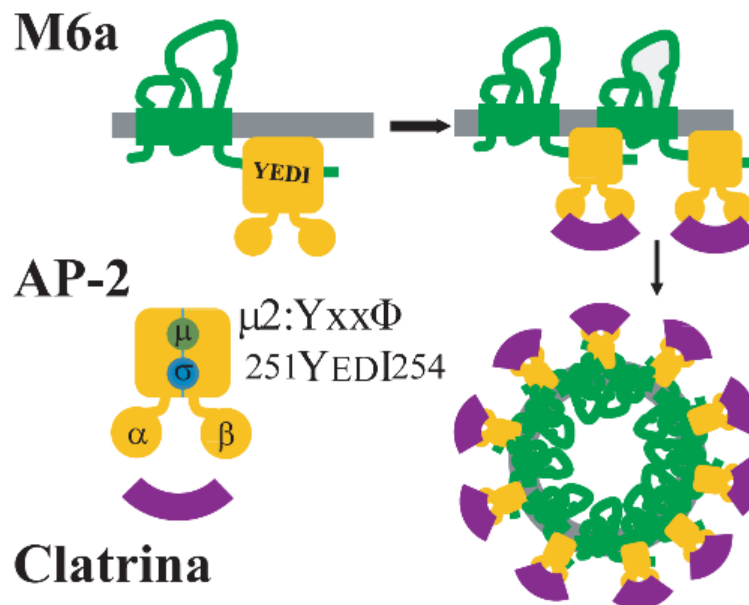


Figura 23: Esquema hipotético de la vía de internalización de M6a por la vía de clatrina (EMC). Esquema de M6a en la membrana celular y su posible internalización por la vía de clatrina. M6a se esquematiza en verde y en el extremo C-terminal posee un motivo basado en tirosina ($^{251}\text{YEDI}^{254}$) que le permitiría interaccionar con la proteína adaptadora AP-2. Esta interacción ocurriría a través de la subunidad μ -2 de AP-2. Luego AP-2 nuclearía a clatrina, generándose un endosoma revestido de clatrina que porta a M6a en su membrana.

Los endosomas revestidos de clatrina participan de la endocitosis de M6a.

Teniendo en cuenta los estudios *in silico* y las evidencias de que clatrina coimmunoprecipita con M6a (Fuchsova, y col., 2015) evaluamos si M6a se encontraba en

endosomas revestidos de clatrina. Esta evaluación la hicimos mediante la utilización de microscopía confocal. Para esto utilizamos neuronas de hipocampo de 15 DIV y células HEK293 que sobreexpresaban M6a-RFP. Una vez realizada la transfección transitoria, de igual manera que los experimentos anteriores, sometimos tanto a las neuronas como a las células HEK293 al AIA. Luego, evaluamos la distribución de M6a y clatrina en los dos tipos celulares. Teniendo en cuenta que la interacción de clatrina con los endosomas tempranos es una interacción breve decidimos hacer la evaluación de endocitosis a tiempos más cortos (Yim, y col., 2005).

En la Figura 24 se pueden observar imágenes obtenidas por microscopía confocal de neuronas de 15 DIV que sobreexpresaban M6a-RFP (se ve en verde) y la inmunomarcación de la cadena pesada de clatrina (se ve en magenta). En estas imágenes representativas se pueden

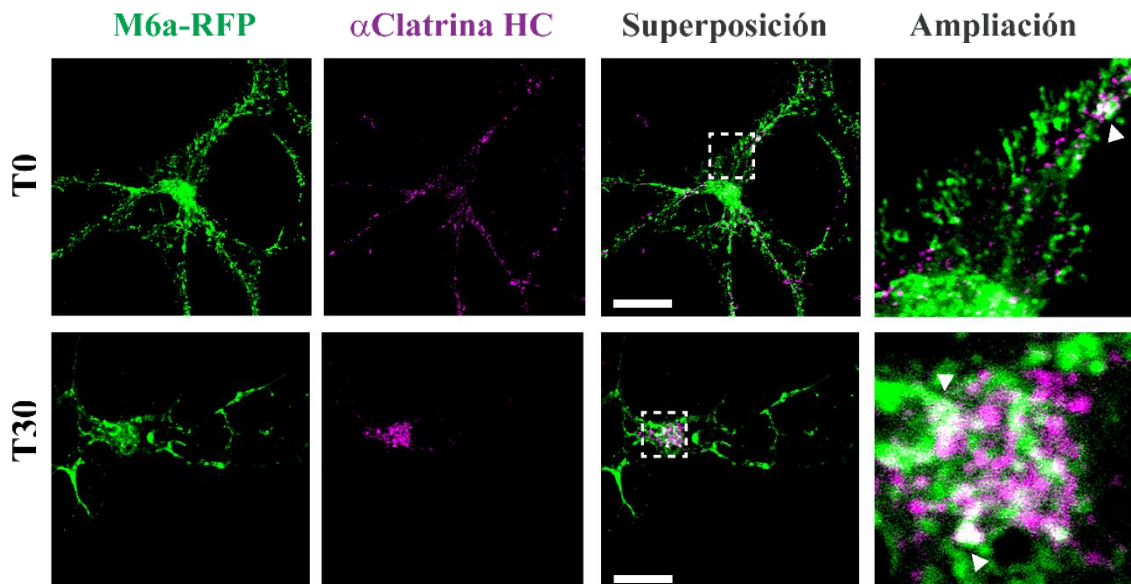


Figura 24: *Clatrina comparte endosomas con M6a en la superficie celular y en vesículas en neuronas de hipocampo.* Imágenes representativas obtenidas con un microscopio confocal de neuronas de 15 DIV que sobreexpresaban M6a-RFP sometidas al AIA (T0 y T30). M6a se muestra en verde y clatrina se muestra en magenta (Anti-HC clatrina 1:700 hecho en conejo). Las cabezas de flecha blancas representan vesículas blancas que indican superposición de ambos canales. Escala 15 μ m.

observar partículas que contienen a clatrina y M6a superpuestas desde T0. Éstas se observan en blanco, en el panel de superposición, restringidas a la superficie celular. A T30 se puede observar que la superposición de los endosomas se hace más evidente. En este caso no sólo se distribuyen a lo largo de la membrana sino que también se localizan en el citoplasma neuronal. Esto último sugiere que a T30 hay mayor superposición de M6a y clatrina que a T0 lo que podría indicar colocalización. Se observaron resultados similares en la línea HEK293 que sobreexpresaba M6a de forma transitoria sometidas al AIA. Es decir, observamos solapamiento de los canales de M6a y de clatrina. En la Figura 25 se muestran imágenes representativas de

las condiciones evaluadas en donde se observó a M6a en verde y a clatrina en magenta. Estas imágenes muestran superposición de ambos canales desde T0 ubicados principalmente en la membrana plasmática. Sumado a esto, luego de 30 minutos de la inmunointernalización de M6a (T30) aumentó el solapamiento de canales. Mayoritariamente las partículas se encontraban en estructuras compatibles con endosomas. La cuantificación de la colocalización entre M6a-RFP y clatrina la hicimos con el *software* FIJI utilizando el *plugin* ComDet (<https://github.com/ekatrunkha/ComDet/wiki>) (Esteves da Silva, y col., 2015).

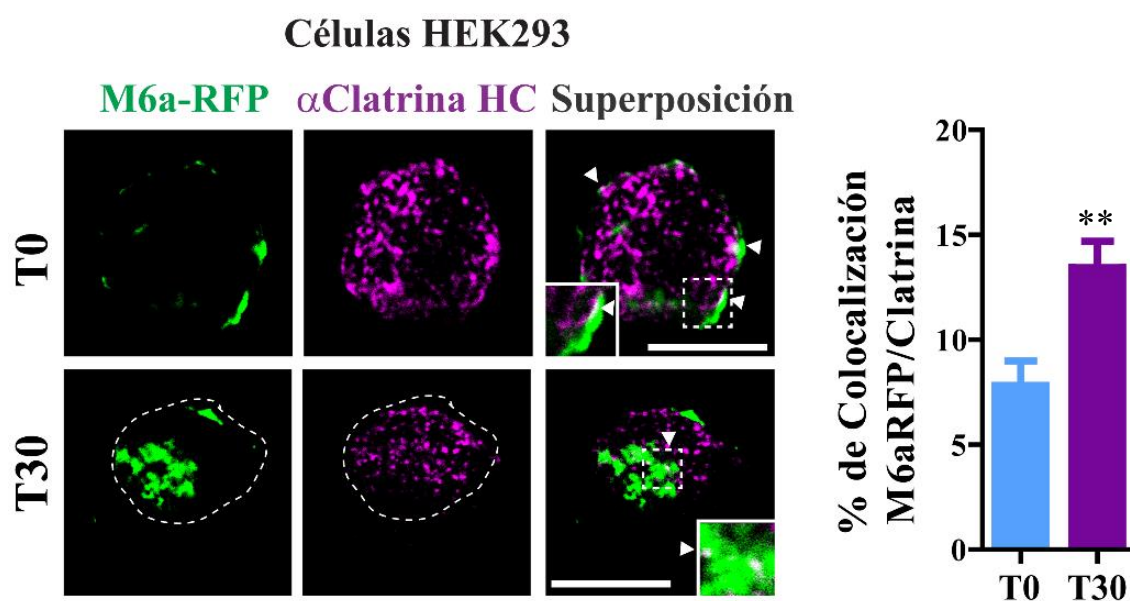


Figura 25: *M6a colocaliza con clatrina en células HEK293*. Imágenes representativas de células HEK293 adquiridas con un microscopio confocal. Las células sobreexpresaban M6a-RFP fueron sometidas al AIA. M6a se observa en verde y en magenta se muestra la inmunomarcación de clatrina endógena (anti-clatrina conejo 1:700). Las cabezas de flecha blancas representan los endosomas de superposición de ambos canales. A la derecha se encuentra la cuantificación de la colocalización con el plugin ComDet del software FIJI. A T1 ($13,44 \pm 1,26$, $n=28$) se puede observar colocalización entre clatrina y M6a comparado con T0 ($7,81 \pm 1,17$, $n=25$; **, $p=0,002$). Escala 15 μm .

Antes de comenzar con los ensayos de cuantificación realizamos la puesta a punto de la técnica. El punto de corte fue calculado a partir de imágenes de inmunofluorescencia tomadas con un microscopio confocal, realizado con células HEK293 que expresaban de forma transitoria M6a-RFP e inmunomarcadas con anti-Rab5 y anti-LAMP-1 luego del AIA a T1. Teniendo en cuenta que estas moléculas (Rab5 y LAMP-1) no comparten vesículas endocíticas realizamos la colocalización entre ellas (Mayor and Pagano, 2007, Neefjes, y col., 2017). Al porcentaje obtenido lo tomamos como el inespecífico para dos proteínas que no colocalizan teniendo en cuenta el método experimental, la adquisición de imágenes y las condiciones de análisis que se mantuvieron para todos los experimentos.

Habiendo determinado el punto de corte, decidimos evaluar la colocalización de M6a-RFP y clatrina en células HEK293. Como se aprecia en la cuantificación obtuvimos un aumento significativo ($p < 0,05$) del porcentaje de M6a que colocaliza con clatrina desde T0 y esto se hace más evidente luego del AIA (T30). Estos resultados acompañan a los obtenidos por las predicciones *in silico*.

A continuación, en este trabajo nos propusimos investigar si la internalización de M6a involucra exclusivamente a la EMC (endocitosis mediada por clatrina) o también a la EIC (endocitosis independiente de clatrina). Para ello utilizamos compuestos que inhiben la EMC como la metil- β -ciclodextrina (MCD) y monensina (mona) e inhibidores de la EIC como filipina (Ceresa, y col., 1998, Rodal, y col., 1999, Wu, y col., 2007, Winterstein, y col., 2008).

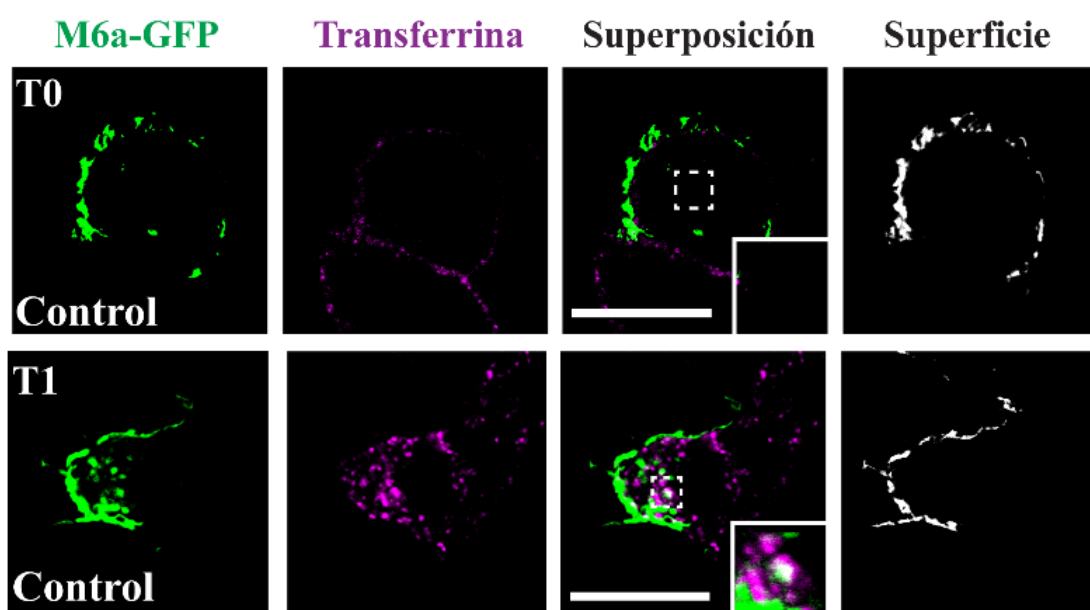


Figura 26: *Parte de M6a endocitada comparte endosomas transferrina positivos*. Imágenes obtenidas por microscopia confocal de células HEK293 representativas de cada condición que sobreexpresaban M6a-GFP (se muestra en verde). Durante el AIA se suplementó al medio de cultivo con Tf-647 (se muestra en magenta) como control de la endocitosis dependiente de clatrina (EMC). La última columna del panel muestra a M6a remanente en superficie en color gris. Las cuantificaciones del porcentaje de endocitosis se muestran en las Figuras 25-28 calculada como se explicó en la Figura 21. La escala es de 15 μm . Ampliación 4x4 μm .

Como modelo de estudio utilizamos células HEK293 que expresaban de forma transitoria a M6a-GFP. Como control de la EMC utilizamos transferrina acoplada a un fluoróforo (Tf-647). Esta fue utilizada para monitorear de forma indirecta la endocitosis del receptor de transferrina (Tf-R). La endocitosis del receptor de transferrina dependiente de clatrina están muy bien caracterizados en bibliografía (Harding, y col., 1983, Iacopetta and Morgan, 1983, Sonnichsen, y col., 2000, Keil and Hatzfeld, 2014). También, se encuentra reportada la utilización de Tf acoplada a un fluoróforo para seguir el tráfico del complejo Tf/Tf-R en varios trabajos

(Winterstein, y col., 2008, Keil and Hatzfeld, 2014).

En la Figura 26 se observan imágenes del control, células HEK293-M6a-GFP sometidas al AIA, en ausencia de inhibidores obtenidas con un microscopio confocal. A T1 se observan endosomas M6a positivos en el citoplasma mientras que a T0 no se observan, como se había descrito anteriormente. Sumado a esto se observan endosomas Tf-R/Tf-647 positivos luego de una hora de inmunointernalización. Es decir, a partir de estas imágenes se realizó el cálculo del porcentaje de M6a en la membrana de igual forma que en las Figuras 21-22. Se procedió del mismo modo para las células que fueron expuestas a los distintos inhibidores.

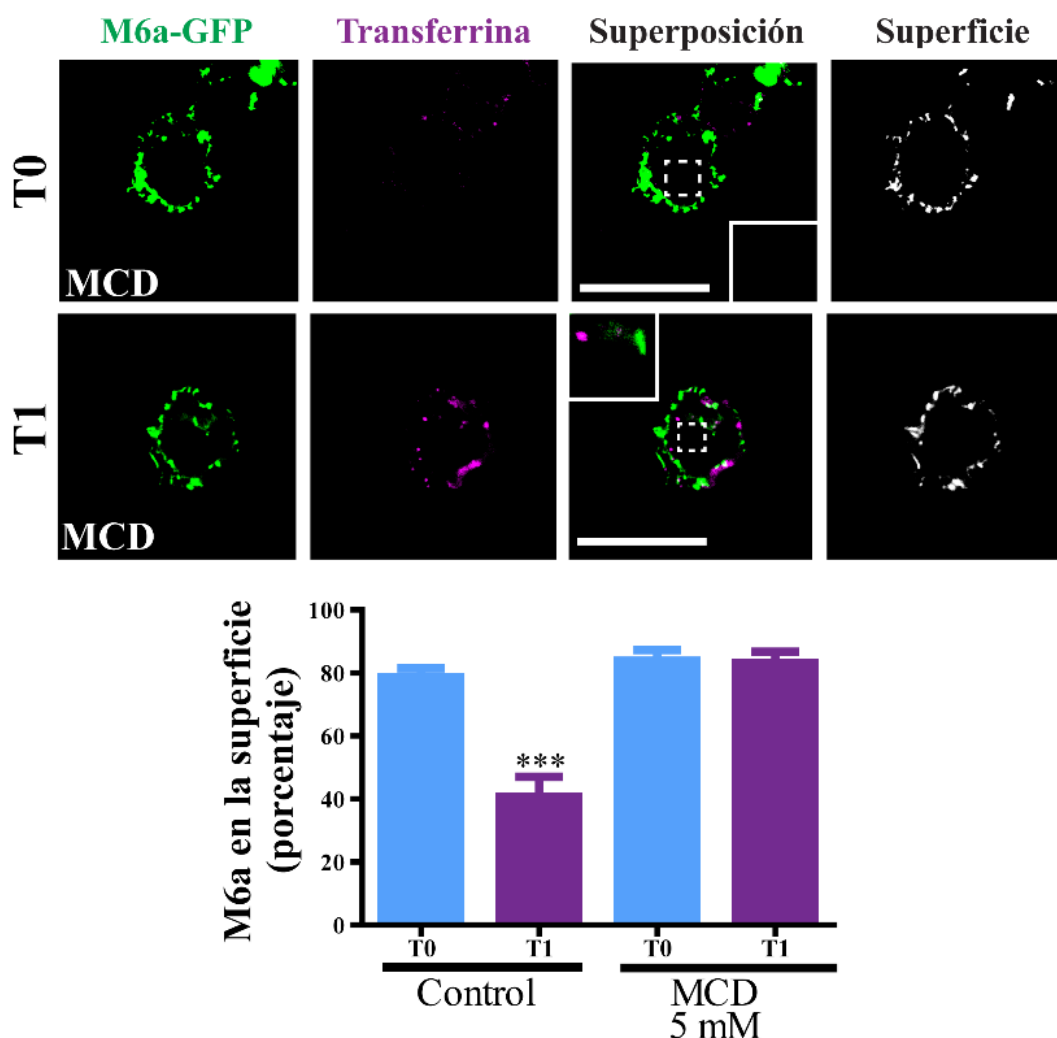


Figura 27: El tratamiento con MCD (metil- β -ciclodextrina) bloquea la internalización de M6a en células HEK293 sometidas al AIA. Imágenes obtenidas por microscopia confocal de células HEK293 representativas de cada condición que sobreexpresaban M6a-GFP (se muestra en verde). Durante el AIA se suplementó al medio de cultivo con Tf-647 (se muestra en magenta) como control del bloqueo de la EMC. Las incubaciones de T0 y T1 fueron en presencia de MCD=5mM que inhibe la EMC. En la última columna del panel se muestra a M6a remanente en superficie en color gris. Debajo se muestra la cuantificación del porcentaje de M6a en la superficie en ausencia y presencia de la droga. Los resultados se muestran como la media + SEM. Las diferencias significativas fueron determinadas por ANOVA de un factor seguido de la prueba de Bonferroni. $F(3,36)=23.60$, $p=0,2548$; ***, $p<0,001$, (Control) T0 vs. T1 ($n=11$). La escala es de 15 μ m. Ampliación 4x4 μ m.

En la Figura 27 se muestran imágenes representativas obtenidas por microscopia confocal de células HEK293-M6a-GFP (se observa en verde) en presencia de MCD durante el AIA. Contrariamente al control, tanto la endocitosis de Tf-R/Tf-647, que se observa en

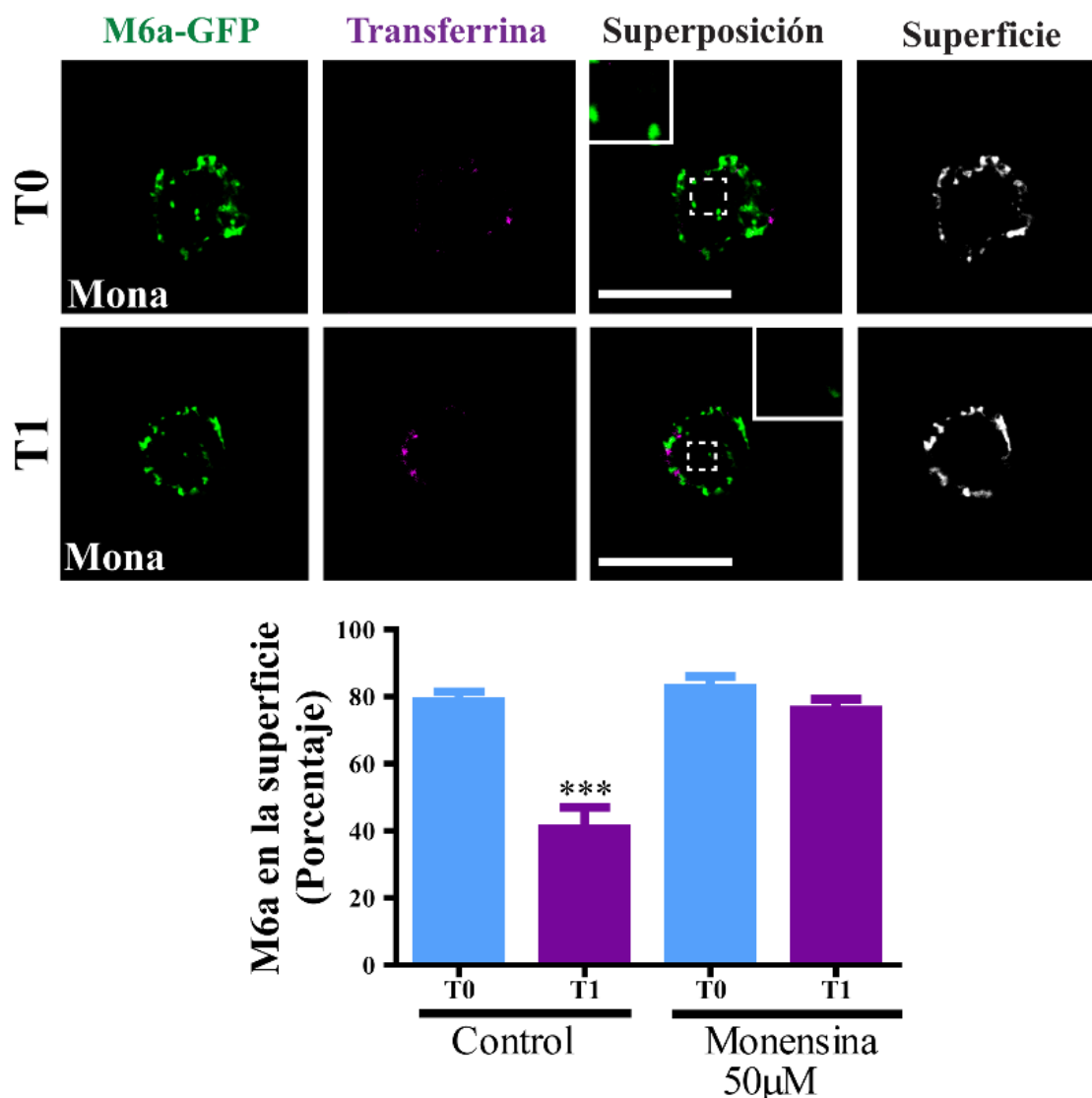


Figura 28: El tratamiento con monensina bloquea la internalización de M6a en células HEK293 sometidas al AIA. Imágenes obtenidas por microscopia confocal de células HEK293 representativas de cada condición que sobreexpresaban M6a-GFP (se muestra en verde). Durante el AIA se incorporó Tf-647 al medio de cultivo (se muestra en magenta) como control del bloqueo de la endocitosis dependiente de clatrina (EMC). Las incubaciones de T0 y T1 fueron en presencia de monensina=50 µM que inhibe la EMC. En la última columna del panel se muestra a M6a remanente en superficie en color gris. Debajo se muestra la cuantificación del porcentaje de M6a en la superficie en ausencia y presencia de la droga. Los resultados se muestran como la media + SEM. Las diferencias significativas fueron determinadas por ANOVA de un factor seguido de la prueba de Bonferroni. $F(3,36)=23.60$, $p=0.2548$; ***, $p<0.001$, (Control) T0 vs. T1 ($n=11$). La escala es de 15 µm. Ampliación 4x4 µm.

magenta, como la de M6a-GFP fueron impedidas en presencia de MCD (5mM). Esto se ve reflejado por un lado en las imágenes donde no se observan partículas positivas para Tf-647 (magenta) o M6a (verde) en el citoplasma. Asimismo, en la cuantificación del porcentaje de M6a en membrana en el control observamos la disminución de M6a a T1 como ya habíamos

descripto. Sin embargo, de manera opuesta a lo obtenido en el control, en presencia de MCD los porcentajes de M6a a T0 y T1 en la superficie no reflejaron diferencias significativas ($p>0,05$).

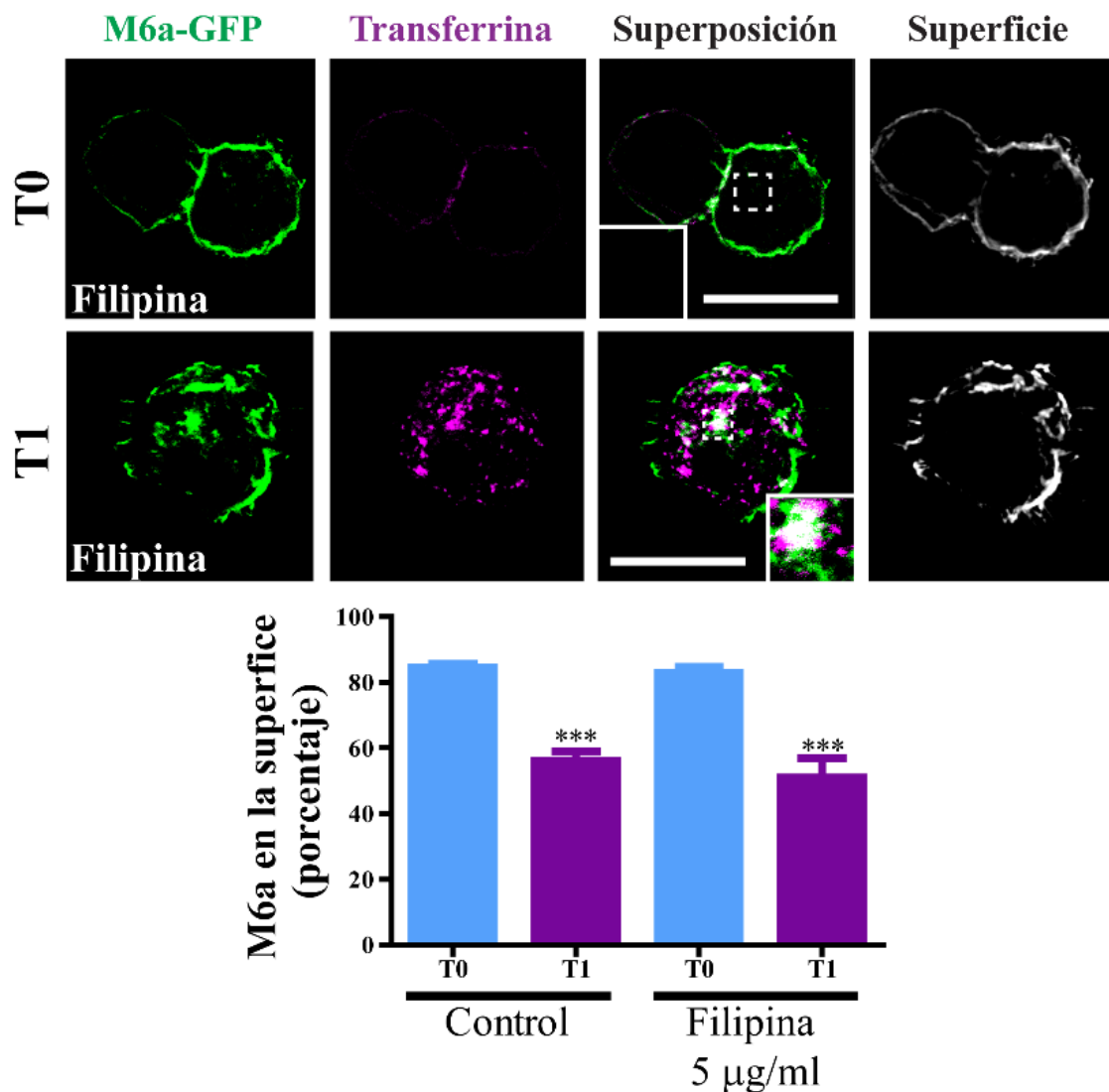


Figura 29: El tratamiento con filipina no altera la internalización de M6a mediado por el tratamiento neutralizante. Imágenes obtenidas por microscopia confocal de células HEK293 de cada condición que sobreexpresaban M6a-GFP (se muestra en verde). Durante el AIA se incorporó Tf-647 al medio de cultivo (se muestra en magenta) como control de la vía dependiente de clatrina (EMC). Las incubaciones de T0 y T1 fueron en presencia de filipina=5 µg/ml que inhibe la EIC. En la última columna del panel se muestra a M6a remanente en superficie en color gris. Debajo se muestra la cuantificación del porcentaje de M6a en la superficie en ausencia y presencia de filipina. Los resultados se muestran como la media + SEM. Las diferencias significativas fueron determinadas por ANOVA de un factor seguido de la prueba de Bonferroni. $F(3,36)=23.60$, $p=0,2548$; ***, $p<0,001$, (Control) T0 vs. T1 ($n=11$), ***, $p<0,001$ T0 vs. T1 (filipina) ($n=9$). La escala es de 15 µm. Ampliación 4x4 µm.

Cuando ensayamos por el AIA células HEK293-M6a-GFP en presencia de monensina obtuvimos un efecto similar a MCD. En la Figura 28 se puede observar que, contrariamente a lo que ocurre en el control (Figura 26 y gráfico de barras Figura 28), tanto la endocitosis de Tf-R/Tf-647 como la de M6a-GFP fue impedida en presencia de monensina. De forma contraria

al control, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de M6a en la superficie entre T0 y T1 en presencia de monensina. Estos resultados muestran que la EMC fue bloqueada tanto con MCD como con monensina.

Cuando realizamos el AIA, en células HEK293-M6a-GFP, en presencia de filipina que es un inhibidor de la EIC (caveolina/*rafts*) no se alteró la endocitosis de M6a. De manera similar al control (Figura 26), como se muestra en la Figura 29 observamos vesículas M6a y Tf-647-positivas en el citoplasma celular indicando la endocitosis de ambas. Cuando realizamos las cuantificaciones del porcentaje de M6a en la superficie obtuvimos valores comparables con el control. Es decir, observamos que M6a en presencia de filipina a T1 se endocitaba mientras que a T0 se mantuvo en la superficie ($p < 0,001$).

Con los ensayos realizados en presencia de los inhibidores pudimos observar que el tratamiento con MCD y con monensina bloquea la endocitosis de M6a. Por el contrario, el ensayo de AIA en presencia de filipina no afectó la internalización de M6a mediada por el anti-M6a-mAb en los tiempos evaluados. Estos resultados sugieren que la endocitosis de M6a sería por la vía EMC y no por la de EIC o bien dependiente de caveolina/*raft*.

La tirosina en la posición 251 de M6a participa de su endocitosis.

Siguiendo con los estudios y en base a las predicciones obtenidas, nos propusimos estudiar si la tirosina en la posición 251 participa de la endocitosis de M6a. En particular, el motivo basado en tirosina ²⁵¹YEDI²⁵⁴ que se encuentra en el extremo C-terminal de M6a podría mediar su endocitosis. Como estrategia utilizamos la mutante de M6a que tiene un reemplazo de la tirosina en la posición 251 por una alanina (Y251A). En nuestro laboratorio se ha demostrado que esta tirosina, que es sitio un de fosforilación, está involucrada en la extensión de neuritas mientras que la mutante bloquea dicho efecto plástico en neuronas y células N2a (Formoso, y col., 2015a).

Utilizamos células HEK293 que sobreexpresaban M6a-GFP o bien la mutante Y251A-GFP y las sometimos al AIA. En la Figura 30 se observan imágenes representativas tanto del control (M6a-GFP) como de la mutante (Y251A-GFP). En el panel A se observa la internalización de M6a a T1 mientras que en el panel B la mutante Y251A permanece en la membrana. En el panel de superposición se observa un completo solapamiento entre Y251A-GFP con el anticuerpo

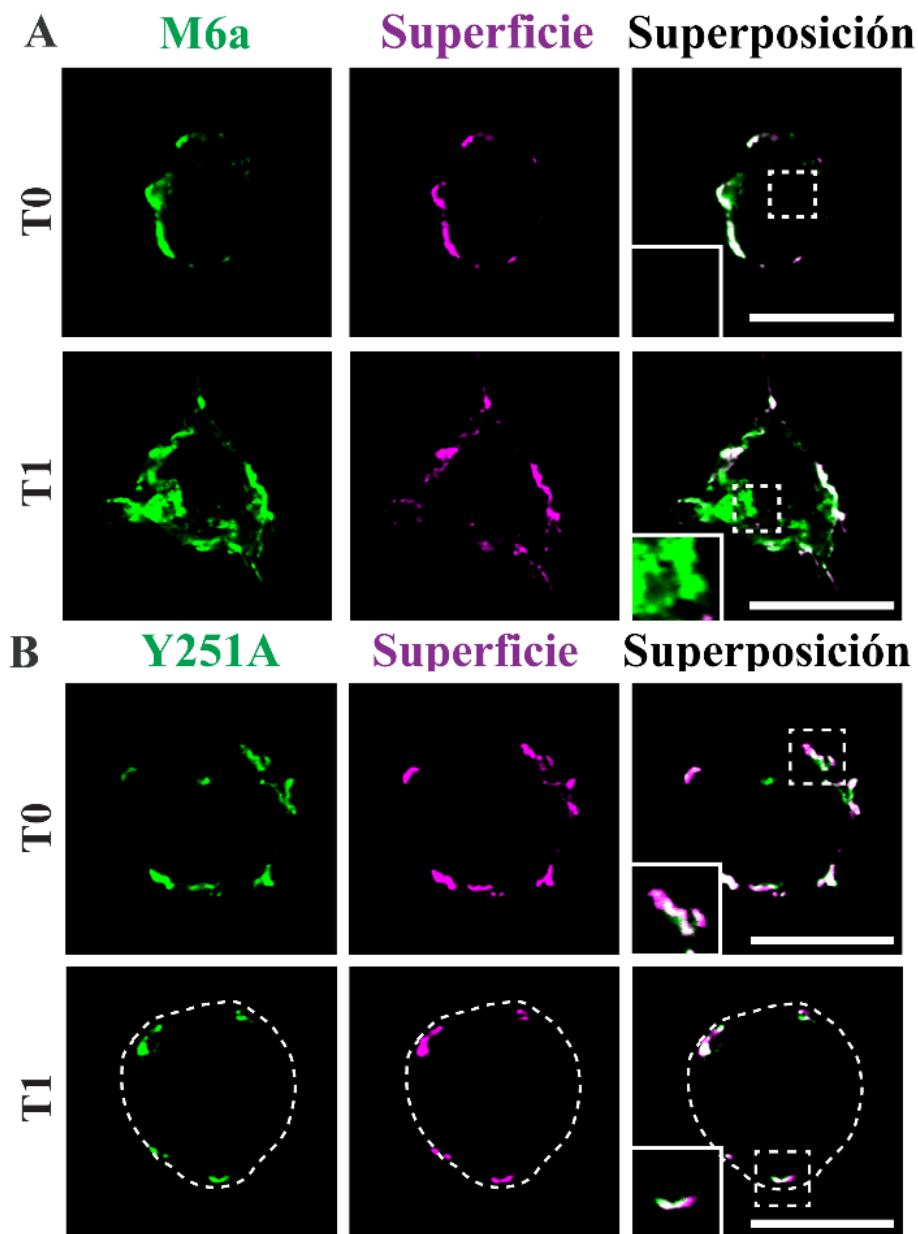


Figura 30: *La tirosina en la posición 251 es requerida para la endocitosis de M6a.* Imágenes representativas de cada condición de células HEK293 que sobreexpresaban M6a-GFP o Y251A-GFP sometidas al AIA. En el panel **A** se muestran células que sobreexpresaban M6a-GFP como control (se muestra en verde). En el panel **B** se muestran células que sobreexpresaban Y251A-GFP (se muestra en verde). Tanto M6a como Y251A remanentes en la membrana se detectaron con un anticuerpo secundario (anti-rata-rhodamina) que se muestra en magenta. La superposición de ambos fluoróforos se observa en blanco en el canal de superposición. Escala 15 μm . Ampliación 4x4 μm .

que marca la superficie (magenta). Esto se puede observar en el panel de superposición como blanco en la membrana plasmática (Figura 30B). Estas observaciones indicarían que el reemplazo de la tirosina en la posición 251 por alanina impide la endocitosis de M6a mediada por el anti-M6a-mAb.

Realizamos la cuantificación del porcentaje de M6a salvaje en la membrana celular y observamos que disminuye significativamente a T1 ($p < 0,0001$) comparado con T0 como ya se describió. Sin embargo, en la Figura 31 observamos que la Y251A permanece en la superficie a T1 y los porcentajes son comparables con T0. Estos resultados sugieren que la tirosina en la posición 251, que forma parte del motivo de tirosina, ²⁵¹YEDI²⁵⁴, tendría un rol relevante en la endocitosis de M6a. Es decir, el motivo YXXΦ se anula cuando se muta la tirosina 251 por una alanina. Esto genera que M6a no se endocite, posiblemente por la falta de interacción con la proteína adaptadora AP-2.

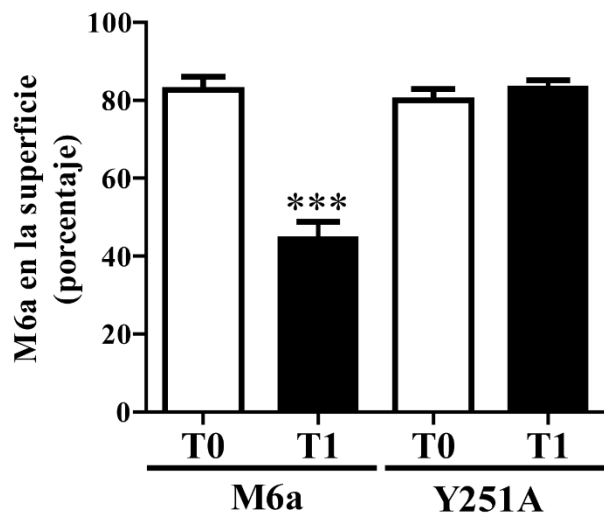


Figura 31: La tirosina en la posición 251 es necesaria para la endocitosis de M6a. Cuantificación del porcentaje de M6a-GFP o la mutante Y251A-GFP en la superficie celular como se explicó en la Figura 21. Los resultados están expresados como la media + SEM. No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de Y251A en la superficie (T0 vs. T1). Las diferencias significativas del control fueron determinadas por ANOVA de un factor seguido de la prueba de Bonferroni. $F(3, 33)=33,54$, $p=0,25$; ***, $p < 0,001$, Control T0 vs. T1 ($n=9$).

En conjunto los resultados de esta sección indican que M6a se internaliza por la EMC. Sustentan esta idea los análisis *in silico* que mostraron que M6a tiene un motivo basado en tirosina que podría ser el responsable de su endocitosis por la EMC. Establecimos un modelo de estudio que nos permitió evaluar la endocitosis y el posible reciclado de M6a. Esto lo hicimos mediante la sobreexpresión de M6a en neuronas de hipocampo y en la línea celular HEK293. Este último nos permitió el estudio del porcentaje de M6a en la membrana luego del AIA. Determinamos cuantitativamente que el porcentaje de M6a en la membrana disminuye por su

endocitosis luego de la inmunointernalización a T1. Utilizando este modelo, demostramos que M6a se endocitaría por la vía de EMC y no por la de EIC. En este mismo sentido la disrupción del motivo basado en tirosina ²⁵¹YEDI²⁵⁴, mediante el reemplazo de Y251A, bloqueó la endocitosis de M6a. Es decir, tenemos evidencias que demuestran que M6a se endocita por la EMC y que el motivo que involucra a la tirosina 251 participa de esta endocitosis.

M6a endocitada es dirigida a endosomas de reciclado y una parte a endosomas degradativos.

En la sección anterior determinamos que M6a se endocitaría exclusivamente por la EMC. Sumado a esto obtuvimos evidencias de que podría ser el motivo basado en tirosina ubicado en el extremo C-terminal de M6a el mediador de esta endocitosis. En esta sección nos propusimos estudiar los posibles destinos intracelulares de M6a.

Como se ha descripto en la introducción, una molécula de membrana puede endocitarse y tener distintos destinos celulares (Figura 5). Una vez formados los endosomas tempranos, característicos por tener a Rab5 y EEA-1 (Christoforidis, y col., 1999), estos pueden sufrir modificaciones. Por un lado, estos pueden progresar hacia endosomas de reciclado tipo Rab11 positivos (vía lenta) o hacia endosomas Rab4 positivos (vía rápida) (Maxfield and McGraw, 2004). Por otro lado, los endosomas tempranos pueden madurar hacia endosomas de tipo tardío característicos por tener a Rab7 en sus membranas. Estos últimos suelen ser más voluminosos que los endosomas tempranos. Los endosomas tardíos pueden dar lugar a la formación de endosomas degradativos tipo LAMP-1 positivos. La transición entre endosomas de tipo Rab7 hacia endosomas degradativos es por fusión de membranas y acidificación de los mismos (Maxfield and McGraw, 2004, Huotari and Helenius, 2011, Escudero, y col., 2014).

Centrifugación diferencial: evaluación del destino de M6a endocitada.

Al determinar que M6a endógena se endocita y que podría reciclarse en la membrana neuronal, tanto por análisis de imágenes de microscopia de fluorescencia como por citometría de flujo, nos interesó estudiar cuál sería su destino endocítico. En primer lugar, utilizamos neuronas de hipocampo maduras y obtuvimos muestras enriquecidas en distintas vesículas endocíticas por la técnica de fraccionamiento subcelular seguido de la identificación proteica por *Western blot*.

El fraccionamiento subcelular es una técnica ampliamente utilizada para enriquecer fracciones subcelulares que tengan propiedades bioquímicas similares (Yamanaka, y col., 2003,

de Araujo, y col., 2008, Winterstein, y col., 2008). Una de las características en las que se basa es la densidad de las moléculas u organelas que se quiere separar. Para separarlas, se realizan gradientes de sacarosa, los cuales pueden ser continuos o discontinuos, y que se generan por diferencias en las densidades de sacarosa. Para generarlos es necesario que la fracción más densa esté en el fondo del tubo y la más liviana hacia el borde del mismo. En nuestro caso utilizamos gradientes discontinuos de sacarosa basándonos en antecedentes bibliográficos (Sobo, y col., 2007).

En particular, las vesículas endocíticas tienen propiedades de flotación diferenciales con respecto a proteínas solubles y otras organelas. Es decir, la muestra cruda, con las vesículas endocíticas de interés, se siembran en el tubo de ultracentrifugación en la fracción de sacarosa más densa. Previamente los núcleos son descartados por centrifugación. Luego, en el transcurso de la ultracentrifugación los endosomas flotan en dirección a la superficie, dirección contraria a la fuerza centrípeta, hasta que su densidad se iguale con la de la sacarosa. Esta separación y enriquecimiento permite separar endosomas tempranos, tardíos, fracción reticular y proteínas solubles. Luego identificamos la presencia de M6a por *Western blot*, utilizando marcadores específicos para cada fracción.

Para el fraccionamiento subcelular partimos de neuronas de hipocampo de 15 DIV y las sometimos al AIA, como ya se ha explicado. Luego del tratamiento, se resuspendieron las células con *scraper* y fueron sometidas a una centrifugación para descartar los núcleos y las membranas plasmáticas de los extractos totales. En el sobrenadante se encontraban las vesículas endocíticas de interés entre otros componentes, y lo denominamos PNS (*post nuclear supernatant*). A este PNS lo sometimos a ultracentrifugación diferencial en un gradiente discontinuo de sacarosa (40,6/35/25/8,5 % de sacarosa). Como paso siguiente a la ultracentrifugación colectamos las fracciones de a un mililitro y reservamos una alícuota para la cuantificación de proteínas. Para cada ensayo de fraccionamiento subcelular hicimos la medición de proteínas por Bradford y consideramos el ensayo exitoso cuando pudimos observar picos de concentración de proteínas bien definidos. Con este método, según lo reportado en bibliografía, se logró enriquecer fracciones de endosomas tempranos (EE), endosomas tardíos (LE), retículo endoplásmico (RE) y proteínas solubles. Proteínas características de los EE son el receptor de transferrina (Tf-R 95 kDa) y la GTPasa pequeña Rab5 (25 kDa). Aquella proteína característica de los LE que nosotros utilizamos es LAMP-1 (55 kDa) presente en la membrana de los lisosomas. La fracción de RE se caracteriza por tener a calnexina (CNX 90 kDa) una chaperona residente de esta organela (Yamanaka, y col., 2003, Winterstein, y col., 2008). Evaluamos la presencia de M6a con el anticuerpo anti-M6a (C-terminal) hecho en conejo en

cada fracción y se espera ver una simple o doble banda de aproximadamente 35 kDa como ya ha sido reportado (Formoso, y col., 2015b).

En la Figura 32 se observan las concentraciones de proteínas por microlitro en función de la fracción medida de dos experimentos independientes. En este gráfico se señalizan las fracciones de interés: EE, LE, RE. El PNS contiene a todas las proteínas presentes en membranas celulares y proteínas citoplasmáticas. Seleccionamos las fracciones correspondientes a los LE, EE, RE y precipitamos las proteínas con tricloroacético (TCA) al 21 %. Una vez precipitadas, las separamos por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) seguido por la transferencia húmeda a membranas de nitrocelulosa. En la Figura 33 se muestran los resultados de dos experimentos independientes. Estas inmunodetecciones fueron realizadas con las proteínas obtenidas en los fraccionamientos 1 (Panel A) y 2 (Panel B) de la Figura 32.

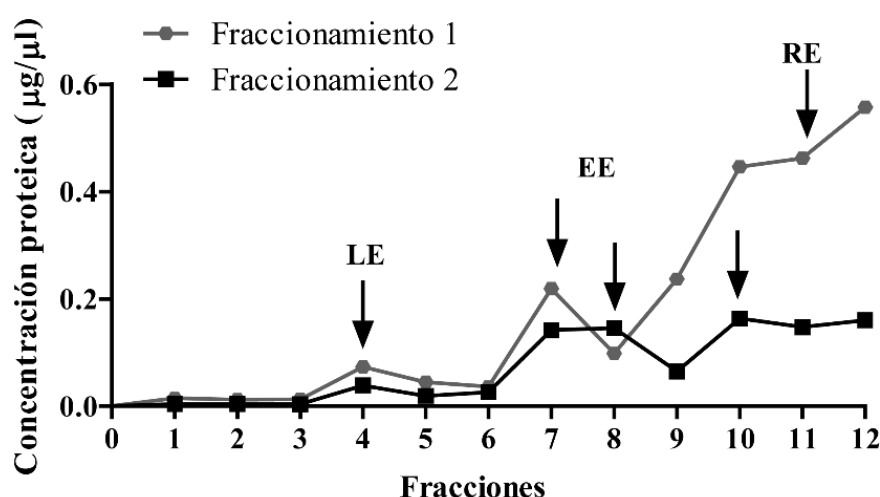


Figura 32: *Fraccionamiento subcelular de neuronas de hipocampo sometidas al AIA*. Se utilizaron neuronas de 15 DIV, tratadas con el anti-M6a-mAb y posteriormente ultracentrifugadas en gradiente discontinuo de sacarosa. Doce fracciones de 1 ml fueron colectadas y por el método de Bradford se determinó la concentración de proteínas (µg/µl) (1-12). Aquí se representan las proteínas por microlitro de dos experimentos independientes. Las flechas indican las fracciones colectadas para cada experimento. LE: endosoma tardío, EE: endosoma temprano y RE: retículo endoplásmico.

En el panel A de la Figura 33A se observa el *Western blot* correspondiente al fraccionamiento 1. En la fracción correspondiente a los LE no hubo detección de LAMP-1 ni de M6a. Cuando evaluamos la fracción correspondiente a EE, como era de esperar, detectamos a Rab5. Sin embargo, detectamos unas bandas compatibles con M6a, CNX y LAMP-1. Esto último nos indica que la separación de proteínas no fue adecuada ya que detectamos marcadores del RE y LE en la fracción de EE como contaminantes. Estos resultados no nos permiten concluir que M6a pertenezca a la fracción de EE y RE dado que la separación de las fracciones

no fue adecuada.

En el panel B (inferior), correspondiente al fraccionamiento 2, detectamos en la fracción correspondiente a los LE a la proteína CNX lo que nos indica que no hubo una buena separación, también detectamos una tenue banda que se corresponde con M6a. Al evaluar la fracción correspondiente a los EE detectamos a Tf-R, Rab5 y M6a. No obstante, CNX también fue encontrada en los EE como contaminante. Esto último indica que no hubo una correcta separación de los endosomas dado que existe contaminación de todas las fracciones con CNX. Estos resultados no fueron concluyentes dado que aparecieron contaminaciones de las fracciones con endosomas. No podemos asegurar que M6a forme parte de los EE y LE dado que podría deberse a la separación incompleta de las fracciones endosomales. Estos resultados no concluyentes nos llevaron a descartar la posibilidad de caracterizar los diferentes tipos de vesículas en las que se encuentra M6a a partir de esta técnica.

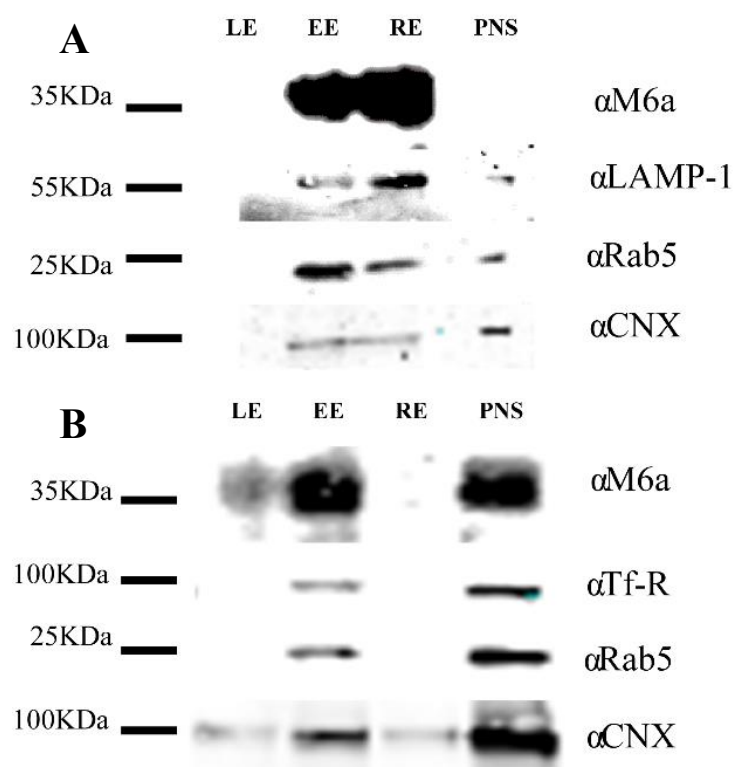


Figura 33: *Western blot a partir del fraccionamiento subcelular de neuronas de hipocampo sometidas al AIA.* Separación de proteínas precipitadas de cada fracción por SDS-PAGE seguida de *Western blot*. Detectamos a M6a con una dilución 1:700 de anti-C-terminal de M6a hecho en conejo, a LAMP-1 con anti-LAMP-1 hecho en ratón 1:100, a Rab5 con anti-Rab5 hecho en conejo con una dilución 1:1000, al receptor de transferrina (Tf-R) con anti-Tf-R 1:700 y calnexina (CNX) dilución 1:2000. **A.** (fraccionamiento 1) Sembramos las proteínas precipitadas de 500 μ l de cada fracción y 5 μ g de PNS. **B.** (fraccionamiento 2) Sembramos 20 μ g totales. LE: endosoma tardío, EE: endosoma temprano y RE: retículo endoplásmico. PNS: *post nuclear supernatant* o fracción cruda de proteínas neuronales.

M6a endocitada se encuentra en endosomas tempranos (Rab5 y EEA1 positivos) y de reciclado lento (Rab11 positivos).

Hasta este punto hemos determinado que M6a se endocita por la vía de clatrina y evidenciamos que la tirosina en la posición 251 tiene un rol central en este proceso. Sin embargo, los estudios realizados por fraccionamiento subcelular no fueron exitosos. Es por esto que decidimos evaluar la ruta endocítica de M6a por ensayos de inmunofluorescencia seguido de microscopia confocal y análisis de imágenes. A modo de *screening* decidimos utilizar a la transferrina para evaluar si M6a se dirige hacia endosomas de reciclado. Por otro lado, utilizamos un marcador de endosomas ácidos, el LysoTracker®, que nos permitió evaluar si M6a podría estar en compartimentos degradativos.

Existen diversos reportes bibliográficos que utilizan a Tf-R/Tf no sólo como modelo de la EMC sino que también como indicador de endosomas de reciclado. El Tf-R una vez que interactúa con la Tf es capaz de formar dímeros en la membrana plasmática lo que favorece la unión de moléculas adaptadoras, como AP-2, y sus extremos citoplasmáticos (Figura 34) (Winterstein, y col., 2008, McMahon and Boucrot, 2011, Keil and Hatzfeld, 2014). Luego el complejo es dirigido hacia endosomas tempranos (Rab5) y de reciclado (Rab11 y Rab4) (Sonnichsen, y col., 2000).

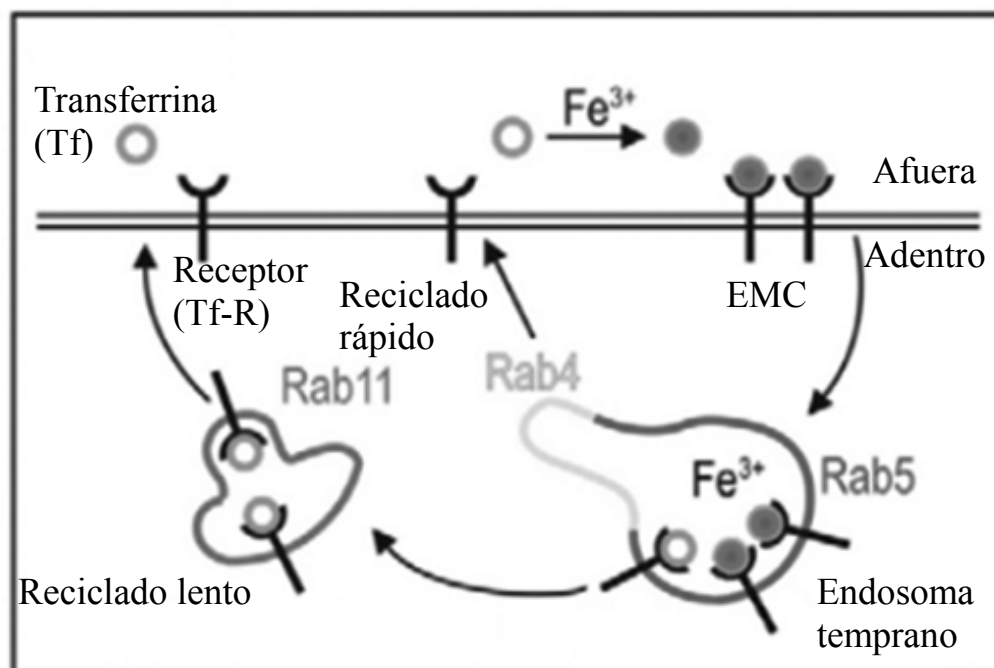


Figura 34: Vía endocítica de la transferrina acoplada a su receptor. Esquema de la endocitosis y reciclado de transferrina (Tf) acoplada a su receptor (Tf-R). Una vez que la transferrina coordinada con el Fe^{3+} se asocia al receptor, éste dimeriza y se endocita por la vía de clatrina. Ya en el citoplasma forma parte de endosomas Rab5 positivos los cuales pueden seguir dos caminos. El primero, el reciclado rápido a cargo de Rab4. El segundo, el reciclado lento por la vía de Rab11. Esquema adaptado de Keil y col. 2014.

Transfectamos neuronas con M6a-GFP transitoriamente (que se muestra en verde). Supplementamos el medio de cultivo, durante el AIA, con Tf-acoplada a Alexa 647 (Tf-647), de igual manera que para las Figuras 26-29, y las estudiamos mediante microscopía de fluorescencia confocal. En la Figura 35 se observa a T1 acumulación de Tf-647 (que se muestra en magenta) en acúmulos compatibles con endosomas. Asimismo, en el panel de superposición de los canales hubo partículas de color blanco. Esto indicaría que la fluorescencia asociada a ambas proteínas se superpone lo que se muestra ampliado en línea punteada. Por el contrario, a T0 se observa la ausencia de Tf-647 en las neuronas (magenta).

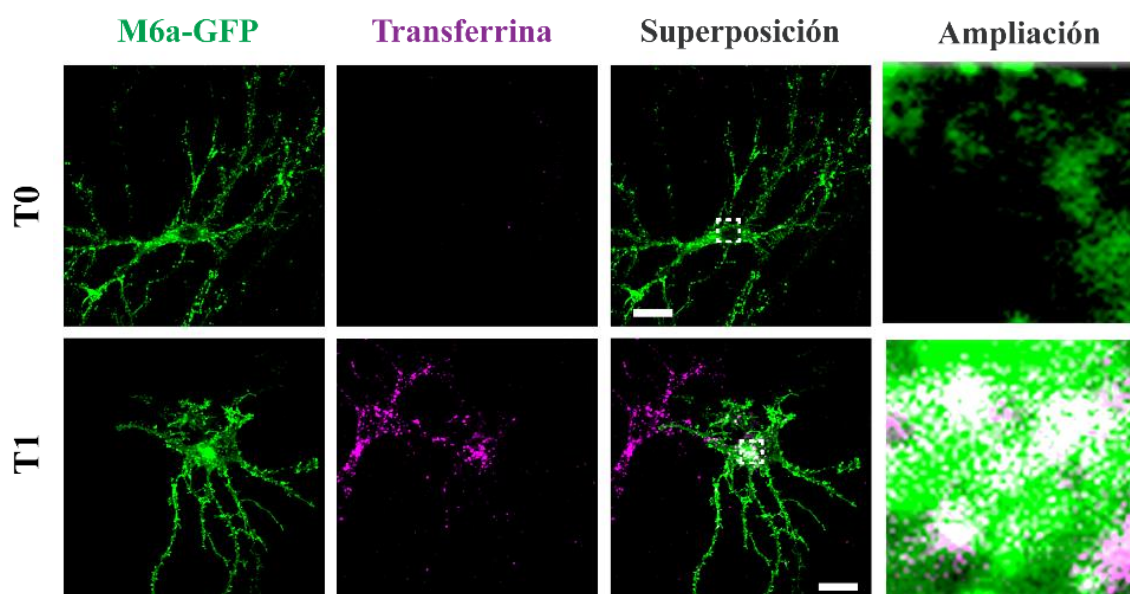


Figura 35: *M6a endocitada es dirigida hacia endosomas de reciclado en neuronas de hipocampo.* Imágenes representativas de neuronas a 15 DIV, luego del AIA, obtenidas con un microscopio confocal. Estas neuronas que sobreexpresaban M6a-GFP (se muestra en verde) fueron expuestas a transferrina acoplada a Alexa 647 (Tf-647 se muestra en magenta) durante el AIA. Se puede observar en blanco la superposición de ambos canales (tercera columna de imágenes). Ampliación 3x3 μm . Escala 15 μm .

Utilizando la misma estrategia evaluamos células de la línea HEK293 que sobreexpresaban M6a-GFP transitoriamente. En la Figura 36 se observan imágenes representativas de cada condición evaluada. Observamos que una proporción de M6a endocitada se encontraba en endosomas Tf-647 positivos a T1, pero no así en el estado estacionario o T0. Esto lo determinamos mediante la superposición de las imágenes donde se observan vesículas de color blanco y fueron destacadas en líneas de puntos. Cuando evaluamos colocalización de M6a endocitada con Tf-647 observamos alrededor del 20 % de colocalización de las vesículas endocíticas a T1. La cuantificación se hizo del mismo modo que en el caso anterior (Figura 25) y los análisis estadísticos mostraron aumentos significativos a T1 comparado con T0

($p < 0,0001$). Estos resultados sugieren que M6a podría reciclarse a la membrana plasmática y compartiría la vía con Tf-R/Tf.

Por otro lado, como se ha descrito en la introducción, una vez que una molécula es endocitada puede ser dirigida hacia degradación. Esto le permite a las células eucariotas mantener la homeostasis de sus proteínas de membrana. Ya sea de la membrana plasmática como de las membranas de los compartimentos subcelulares. Asimismo, en determinados momentos del desarrollo de una célula es necesario reemplazar el repertorio de proteínas, siendo las vías de degradación proteica más clásicas la proteólisis mediada por lisosomas o por proteosomas. De esta manera las células se adaptan al ambiente en donde se estén desarrollando (Ciechanover, 2005).

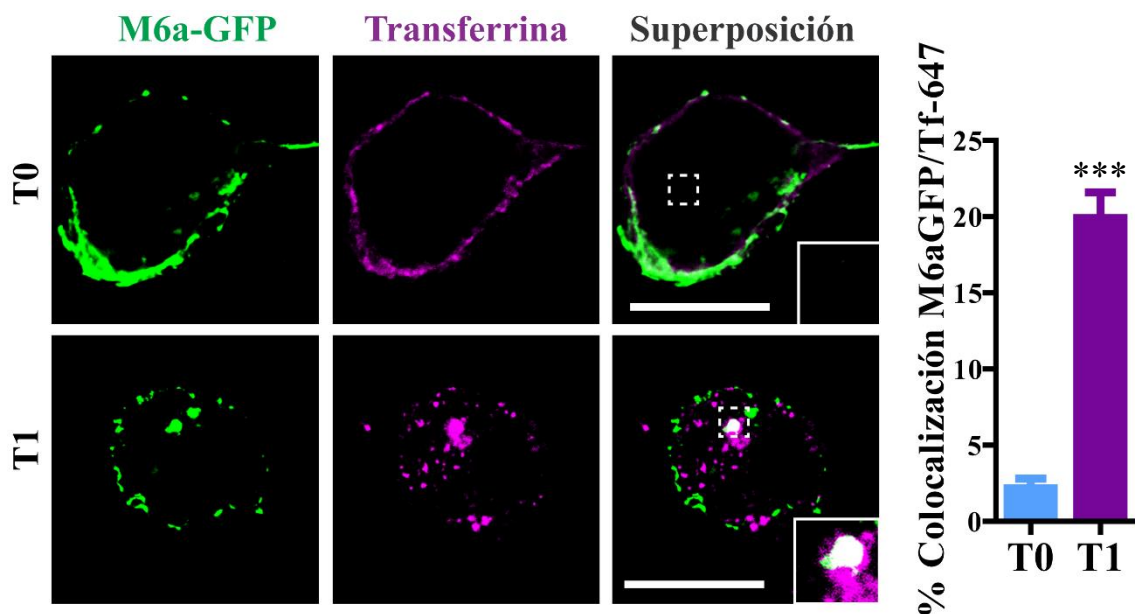


Figura 36: *M6a endocitada es dirigida hacia endosomas de reciclado en células HEK293*. En el panel se muestran imágenes representativas de células HEK293 sometidas al AIA. Estas células sobreexpresaban M6a-GFP (se muestra en verde) y fueron expuestas a Tf acoplada a Alexa 647 (Tf-647 se muestra en magenta) durante el AIA. Se puede observar en blanco la superposición de ambos canales (tercera columna de imágenes). La cuantificación de la colocalización se realizó con el *plugin* ComDet del procesador de imágenes FIJI. A T1 se detecta colocalización entre M6a y Tf. A T1 ($19,91 \pm 1,67$, $n=33$) se puede observar colocalización entre Tf y M6a comparado con T0 ($2,17 \pm 0,62$, $n=28$; ***, $p < 0,0001$). Las diferencias estadísticas fueron determinadas con el *Student's T-test* y fueron los valores graficados como la media + SEM. Escala 15 μm . Ampliación 4x4 μm .

Como segunda estrategia de *screening* evaluamos si M6a una vez endocitada se encontraba en compartimentos endocíticos tardíos típicamente ácidos y posiblemente degradativos. Utilizamos un compuesto capaz de interactuar con endosomas tipo ácidos el LysoTracker® *Deep red*. Este compuesto se puede observar por microscopia de fluorescencia bajo la excitación de un láser rojo lejano (647 nm). Además, el compuesto es capaz de atravesar las membranas celulares, con lo cual se puede realizar una marcación *in vivo*. Este compuesto nos indica si M6a podría estar siendo degradada en compartimentos tipo ácidos. Uno de los

compartimentos ácidos son los lisosomas, pero no todas las proteínas residentes del lisosoma son degradadas. Este es el caso de PLP, otro miembro de la familia, utiliza los lisosomas como endosomas de reservorio (Winterstein, y col., 2008, White and Kramer-Albers, 2014).

Para esto utilizamos neuronas de hipocampo de 15 DIV que fueron transfectadas con M6a-GFP de forma transitoria. Durante el ensayo del AIA colocamos el LysoTracker® *Deep red* en el medio de cultivo. En la Figura 37 se muestran imágenes representativas obtenidas por microscopía confocal de cada condición ensayada. Particularmente a T1 observamos que M6a se encontraba en endosomas LysoTracker® positivos. Esto lo asumimos dado que en las imágenes superpuestas hay endosomas blancos que indican la superposición de M6a en verde y del LysoTracker® en magenta en el citoplasma. Destacamos en línea de puntos una porción representativa. Sin embargo, la marca de LysoTracker® positiva a T0 es escasa.

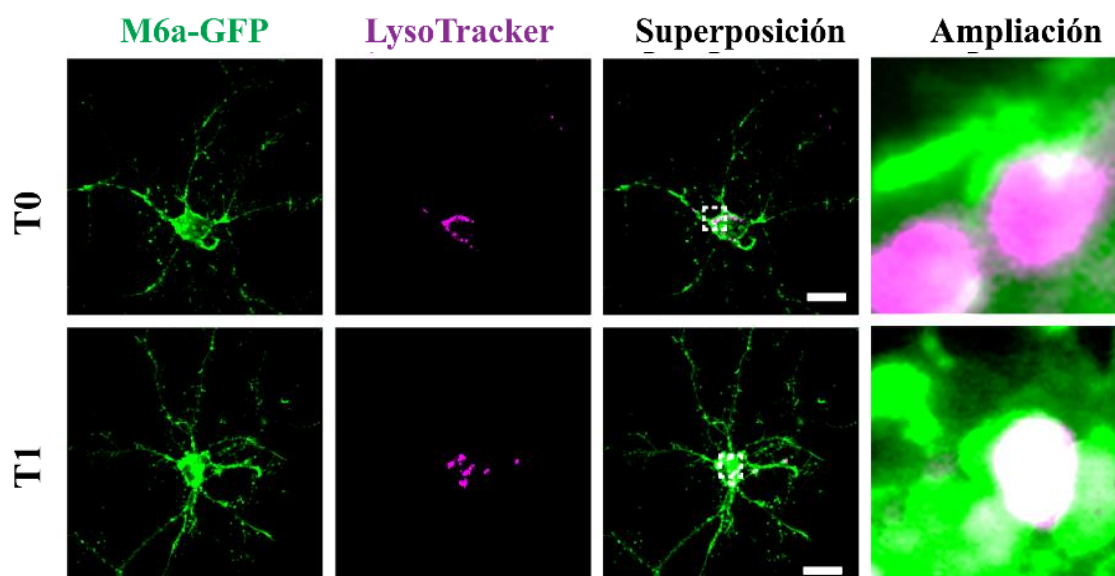


Figura 37: *M6a* endocitada es enviada a endosomas tipo ácidos en neuronas de hipocampo. Imágenes representativas de neuronas de 15 DIV que sobreexpresaban M6a-GFP. Estas células fueron sometidas al AIA en presencia de LysoTracker® en el medio de cultivo. Este reactivo se acumula en endosomas ácidos (se muestra en magenta). A T1 se puede observar que existe superposición de ambos canales que se evidencia en color blanco en la ampliación. Ampliación 3x3 μm . Escala 15 μm .

Cuando utilizamos la misma estrategia con células HEK293-M6a-GFP obtuvimos resultados similares. En la Figura 38 se muestran imágenes representativas obtenidas por microscopía confocal en donde observamos que a T1 M6a endocitada estaba en endosomas LysoTracker® positivos. Por el contrario, a T0 no observamos marca del LysoTracker®. Acompañando a las observaciones en la cuantificación de la colocalización determinamos que a T1 alrededor del 20 % de los endosomas contenían a M6a y la marca de los endosomas tipo ácidos. Mientras que a T0 no detectamos colocalización ($p < 0,009$).

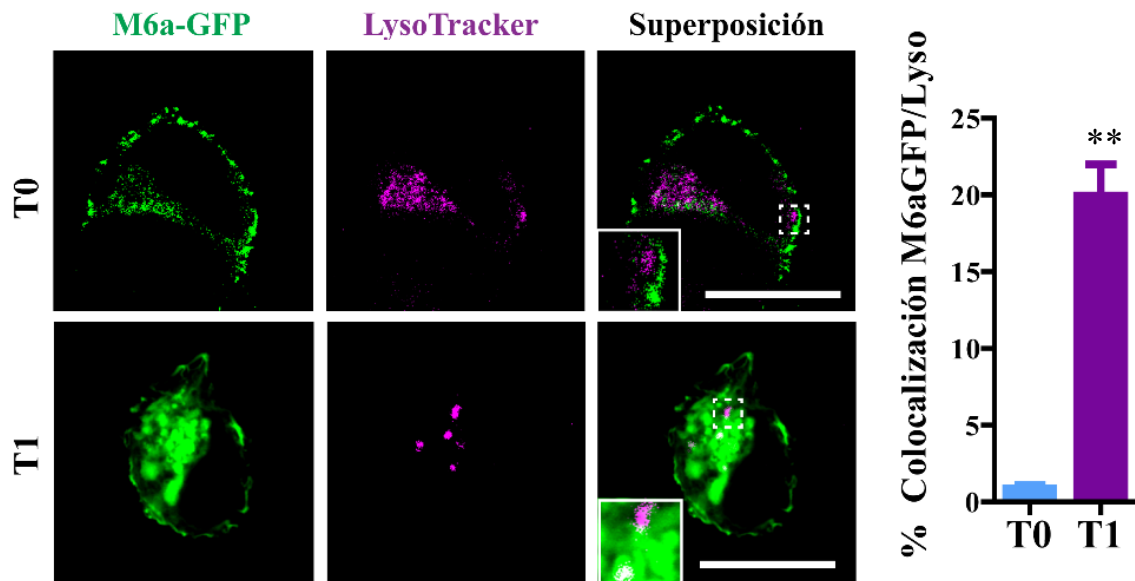


Figura 38: *M6a* endocitada es enviada a endosomas tipo ácidos en células HEK293. Células HEK293 que sobreexpresaban M6a-GFP (se muestra en verde) fueron sometidas al AIA. Estas células fueron ensayadas en presencia de LysoTracker® en el medio de cultivo (se muestra en magenta). A T1 se evidencia la superposición de los canales verde y magenta como aparición de acúmulos blancos. Realizamos las cuantificaciones de colocalización con el *software* ComDet del procesador de imágenes FIJI. Se muestra una mayor colocalización a T1 ($19,97 \pm 2,04$, $n=35$) entre M6a y el LysoTracker® comparado con T0 ($0,88 \pm 0,20$, $n=35$; **, $p=0,009$). Las diferencias estadísticas fueron determinadas con el *Student's T-test* y fueron los valores graficados como la media + SEM. Ampliación 4x4 μm . Escala 15 μm .

Estos estudios de *screening* con reactivos fluorescentes sugieren que M6a se internaliza y una parte podría, por un lado, ser reciclada hacia la membrana plasmática y, por el otro, dirigirse hacia la vía degradativa. Teniendo en cuenta que una proporción de M6a endocitada se localiza en endosomas de tipo reciclado (Tf positivos) y otra en endosomas de tipo ácido (LysoTracker® positivos) nos preguntamos cuáles eran los endosomas intermediarios. Es característico que un endosoma recién formado progrese hacia endosomas tempranos. Esto es independiente de cual haya sido la vía de endocitosis si la EMC o la EIC. Reportes bibliográficos señalan que los endosomas tempranos se caracterizan por contener en sus membranas a la GTPasa pequeña Rab5. Seguido de lo cual, interactúa con efectores que van a definir su posterior destino. Entre ellos se encuentra EEA-1 que es un efector río abajo de Rab5 (Christoforidis, y col., 1999).

Es por esto que decidimos evaluar si M6a se encontraba en endosomas tempranos tipo Rab5 y EEA-1 positivos. Con este objetivo, cultivamos neuronas de hipocampo durante 15 DIV y se las transfectó de forma transitoria con M6a-RFP. En este caso ensayamos a M6a transfectada con Rab5 endógena a T0 y T30 ya que la vida media de estos endosomas es corta (Escudero, y col., 2014). Tomamos imágenes representativas de cada condición ensayada con un microscopio confocal. En la Figura 39, M6a se representa en verde y Rab5 endógena en magenta.

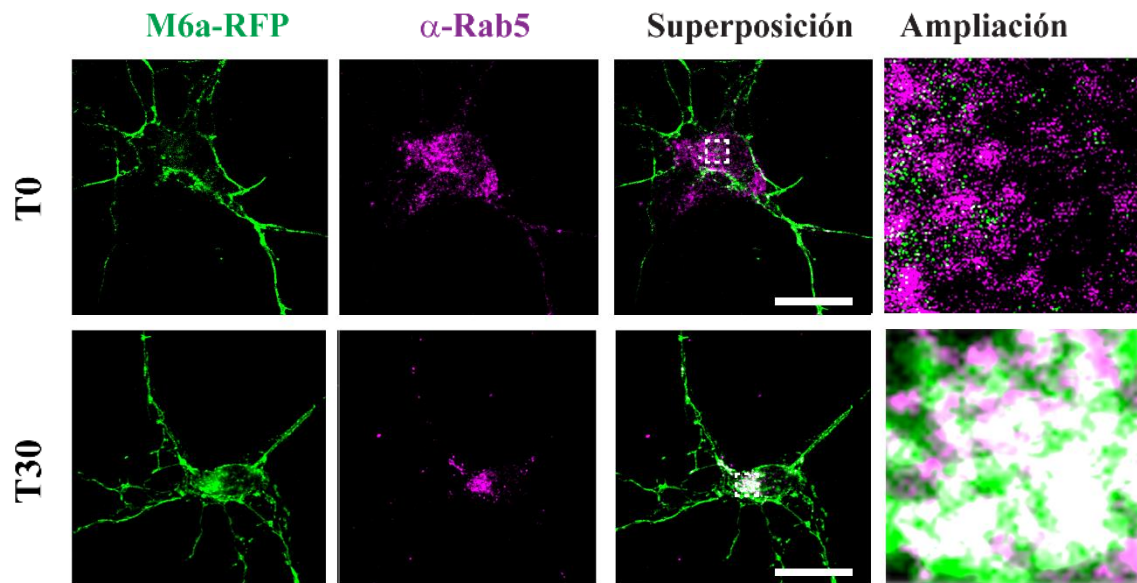


Figura 39: *M6a* endocitada es dirigida hacia endosomas tempranos Rab5 positivos en neuronas de hipocampo. Imágenes representativas adquiridas con un microscopio confocal de neuronas de 15 DIV que sobreexpresaban M6a-RFP (se muestra en verde) que fueron sometidas al AIA. Posteriormente fueron fijadas y se realizó la inmunomarcación de Rab5 (Anti-Rab5 1:1000 hecho en conejo) endógeno (se muestra en magenta). Se observa el solapamiento de ambos canales que se visualiza en blanco. Ampliación 4x4 μm . Escala 15 μm .

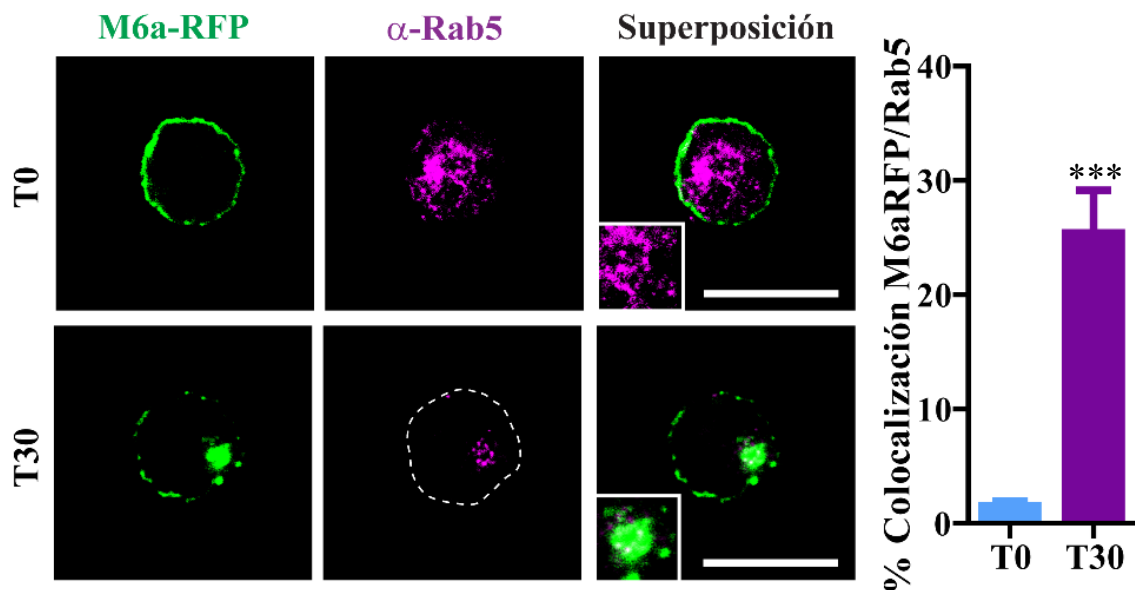


Figura 40: *M6a* endocitada es dirigida hacia endosomas tempranos Rab5 positivos en células HEK293. Imágenes representativas obtenidas por microscopía confocal de células HEK293 de cada condición ensayada. Éstas sobreexpresaban M6a-RFP (se muestra en verde) y fueron sometidas al AIA. Luego del ensayo las células fueron fijadas e inmunomarcadas con anti-Rab5 hecho en conejo (1:1000) (se muestra en magenta). Se puede observar el solapamiento de los canales en blanco. A la derecha se observan las cuantificaciones que reflejan el porcentaje de colocalización entre M6a y Rab5 donde se muestra de colocalización a T30 ($25,42 \pm 3,71$, $n=33$) no así a T0 ($1,55 \pm 0,38$, $n=27$; ***, $p<0,0001$). Las diferencias estadísticas fueron determinadas con el *Student's T-test* y fueron los valores graficados como la media + SEM. Escala 15 μm . Ampliación 4x4 μm .

Pudimos observar la distribución de Rab5 en el citoplasma de forma puntilleada compatible con endosomas tempranos. Cuando sometimos a las neuronas al AIA observamos que a T30 había partículas de color blanco. Estas partículas indican la superposición de ambos canales, sugiriendo que ambas proteínas están muy cercanas.

Al realizar el mismo ensayo con células HEK293-M6a-RFP (en verde) obtuvimos resultados similares. Se observa en la Figura 40 que la distribución de Rab5 endógena, de color magenta, también fue de forma puntilleada a lo largo del citoplasma lo que es compatible con endosomas tempranos. Sumado a esto, a T30, M6a y Rab5 endógena se encontraban solapadas lo que se observa como partículas blancas en el panel de superposición. Realizamos la cuantificación de la colocación con el *plugin* ComDet y observamos que un 25 % de M6a endocitada se encuentra en endosomas Rab5 positivos. Este porcentaje es significativamente mayor al valor obtenido para T0 ($p < 0,0001$).

En el mismo sentido, cuando se realizó la coexpresión de M6a-RFP con Rab5-GFP, de manera transitoria en neuronas de 15 DIV, obtuvimos un patrón de distribución celular comparable con Rab5 endógena. Es decir, en las imágenes obtenidas con un microscopio confocal a T30 hubo solapamiento de ambos canales. Sin embargo, a T0 también se observaron endosomas de color blanco en el panel de superposición lo que sugiere que contienen a ambas proteínas sobreexpresadas desde el comienzo del AIA (Figura 41). Al igual que ocurre en neuronas, cuando evaluamos células HEK293 que coexpresaban M6a y Rab5 observamos un

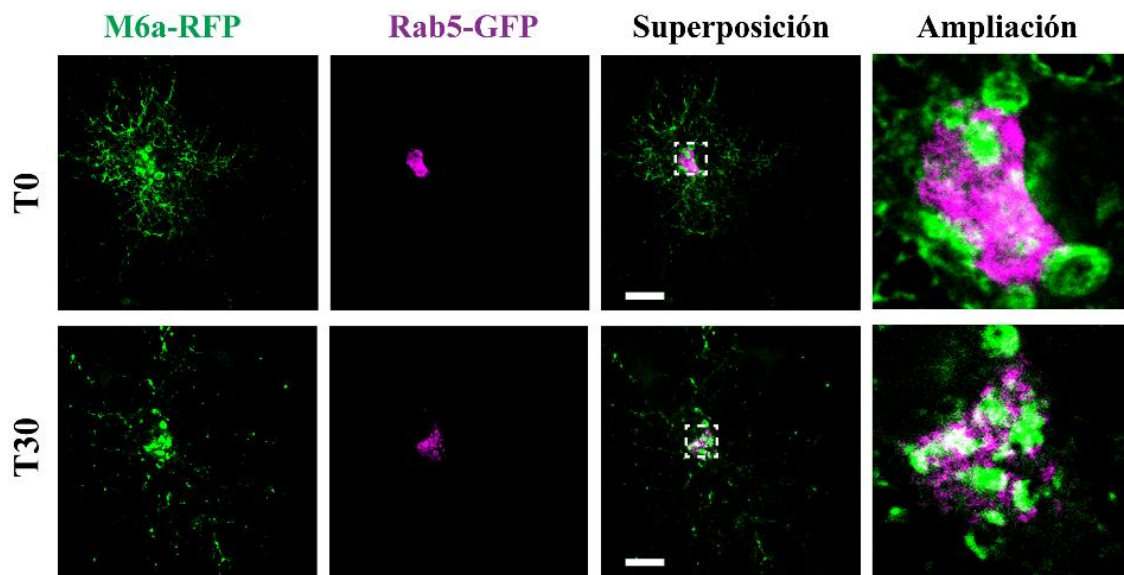


Figura 41: *M6a endocitada es dirigida hacia endosomas Rab5 positivos cuando Rab5 es sobreexpresada en neuronas de hipocampo.* Imágenes representativas de cada condición ensayada de neuronas de 15 DIV que fueron sometidas al AIA. Estas células coexpresaban M6a-RFP (que se muestra en verde) y Rab5-GFP (que se muestra en magenta). Se puede observar un solapamiento de ambos canales (color blanco en la tercera columna). Ampliación 4x4 μm . Escala 15 μm .

aumento en el solapamiento de las fluorescencias de las imágenes a T30. Del mismo modo, desde T0 hay endosomas blancos que indican la superposición de los canales. Esto se ve reflejado en la cuantificación en donde la colocalización tiene un incremento significativo ($p < 0,03$) a T30 comparado con T0 (Figura 42).

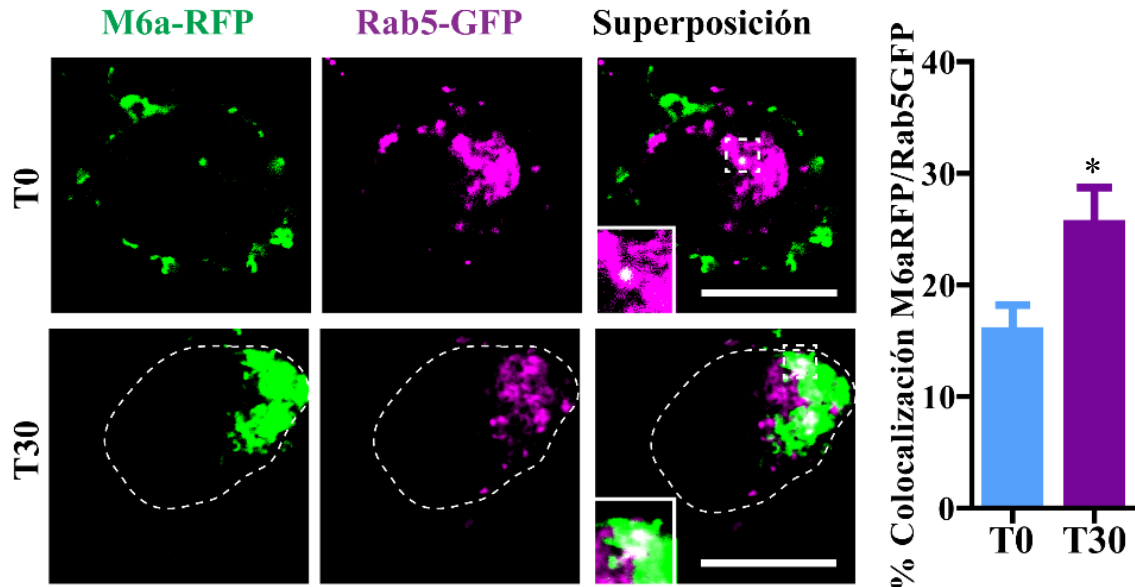


Figura 42: *M6a* endocitada es dirigida hacia endosomas *Rab5* positivos cuando *Rab5* es sobreexpresada en células HEK293. Imágenes representativas de células HEK293 en cada condición ensayada obtenidas por microscopía confocal. Estas células coexpresaban M6a-RFP (se muestra en verde) y Rab5-GFP (se muestra en magenta) y fueron sometidas al AIA. Se puede observar el solapamiento de los canales en blanco. A la derecha se observan las cuantificaciones que reflejan el porcentaje de colocalización entre M6a y Rab5 donde se observa un aumento significativo de colocalización a T30 ($25,48 \pm 3,27$, $n=21$) comparado con T0 ($15,88 \pm 2,33$, $n=17$; *, $p < 0,03$). Las diferencias estadísticas fueron determinadas con el *Student's T-test* y fueron los valores graficados como la media + SEM. Escala 15 μm . Ampliación 4x4 μm .

Siguiendo con el estudio, nos propusimos evaluar si M6a se encontraba en endosomas tempranos tipo EEA-1 positivos luego del AIA. Se transfectaron neuronas de 15 DIV de forma transitoria con M6a-GFP (que se observa en verde) y se hizo la inmunomarcación de EEA-1 endógeno (que se observa en magenta) (Figura 43). En las imágenes representativas se puede observar que a T30, no a T0, parte de M6a endocitada se superpone con la marca de EEA-1.

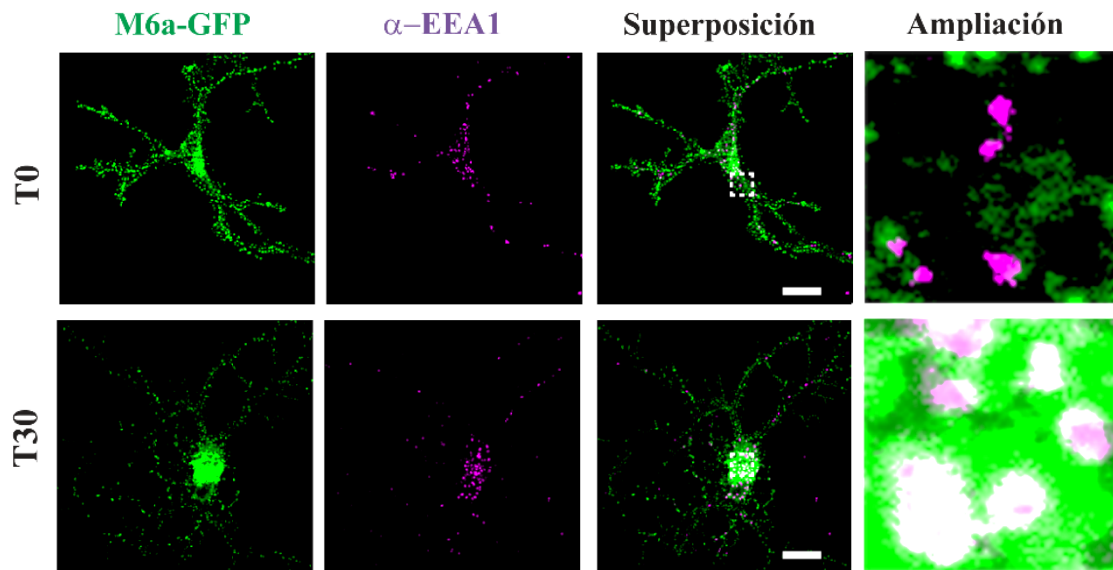


Figura 43: *M6a* endocitada es dirigida hacia endosomas *EEA-1* positivos en neuronas de hipocampo. Imágenes obtenidas por microscopía confocal que representan a cada condición ensayada. Estas neuronas de 15 DIV sobreexpresaban *M6a-RFP* (se muestra en verde) y fueron sometidas al AIA. Al finalizar el ensayo las neuronas fueron fijadas e inmunomarcadas con anti-*EEA1* (hecho en conejo 1/700) (se muestra en magenta). Se puede observar el solapamiento de los canales a T30 (se observa en blanco en el panel de superposición) no así a T0. La escala es de 15 μm . Ampliación 4x4 μm .

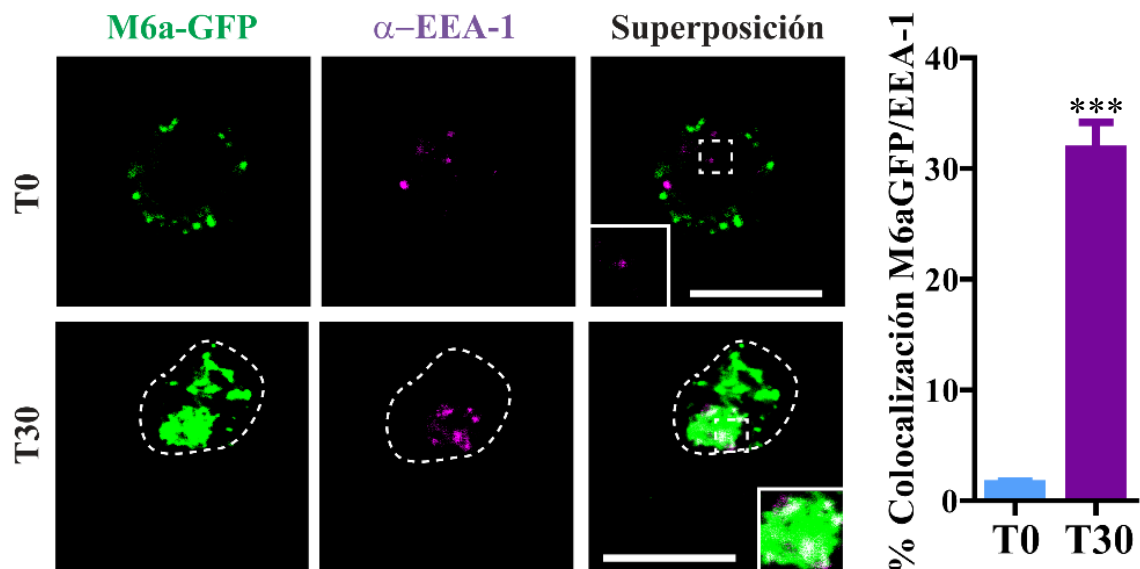


Figura 44: *M6a* endocitada es dirigida hacia endosomas *EEA-1* positivos en células *HEK293*. Fotos adquiridas por microscopía confocal de cada condición ensayada en donde se observan células *HEK293* que sobreexpresaban *M6a-RFP*. Estas células fueron sometidas al AIA y posteriormente fijadas e inmunomarcadas con anti-*EEA1* (hecho en ratón 1/700) (se muestra en magenta). En las superposiciones se puede observar en blanco el solapamiento de los canales. A la derecha se observa la cuantificación del porcentaje de colocalización entre ambas proteínas. Se observa más del 30 % de colocalización a T30 ($31,76 \pm 2,41$, $n=34$; ***, $p<0,0001$) mientras que a T0 ($1,50 \pm 0,29$, $n=34$; ***, $p<0,0001$) no se observa colocalización. Las diferencias estadísticas fueron determinadas con el T-test de Student y fueron los valores graficados como la media + SEM. La escala es de 15 μm . Ampliación 4x4 μm .

De forma similar, ensayamos por el AIA células HEK293-M6a-GFP como se muestra en la Figura 44. Asimismo, cuando evaluamos si M6a (que se muestra en verde) y EEA-1 (que se muestra en magenta) compartían endosomas. Los resultados obtenidos fueron los mismos que los hallados en neuronas. La cuantificación de la colocación indica que M6a y EEA-1 colocan a T30 mientras que a T0 no ($p < 0,0001$). Resultados similares fueron hallados por Sato y colaboradores en células HEK293 que sobreexpresaban M6a y fueron expuestas al anti-M6a clon 1B4 durante dos horas (Sato, y col., 2011b). Estos resultados sugieren que M6a una vez que es endocitada, forma parte de endosomas tempranos y se caracterizan por ser del tipo Rab5 y EEA-1 positivos.

Con el fin de evaluar el reciclado de M6a utilizamos neuronas de hipocampo y células de la línea HEK293 y las cotransfectamos de manera transitoria con M6a-RFP y Rab11-GFP. Ensayamos ambos tipos celulares por el AIA y obtuvimos imágenes representativas de cada condición ensayada por microscopía confocal. En la Figura 45 se observa a M6a (se muestra en verde) y Rab11 (se muestra en magenta) que desde T0 comparten endosomas. Además, a T1 se observa que el solapamiento aumentó, como se puede notar en las regiones destacadas con línea de puntos.

Cuando evaluamos células HEK293 cotransfectadas, obtuvimos resultados similares. Es decir, detectamos vesículas en donde M6a y Rab11 se solapaban desde T0 y esto fue más evidente a T1. Cuando realizamos los análisis de colocación determinamos que ambas proteínas colocaban desde T0. Además, a T1 evidenciamos que la colocación aumentaba de forma significativa ($p < 0,0001$) respecto de T0 (Figura 46). Estos resultados indican que M6a se reciclaría hacia la membrana plasmática por la vía lenta en endosomas Rab11 positivos; vía que comparte con Tf-R/Tf. Aunque no podemos descartar que se recicle también por la vía rápida de Rab4.

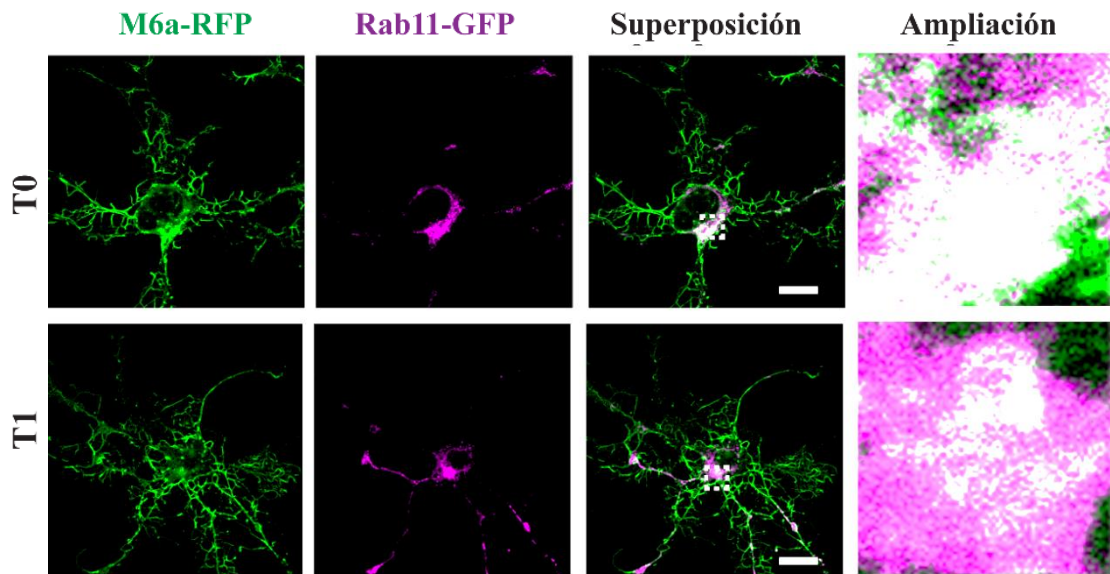


Figura 45: *M6a* endocitada es dirigida hacia endosomas de reciclado lento *Rab11* positivos en neuronas de hipocampo. Imágenes representativas obtenidas por microscopía confocal de neuronas de 15 DIV. Éstas células coexpresaban M6a-RFP (se muestra en verde) y Rab11-GFP (se muestra en magenta) y fueron sometidas al AIA. El solapamiento de los canales se observa en blanco. La escala es de 15 μm . Ampliación 4x4 μm .

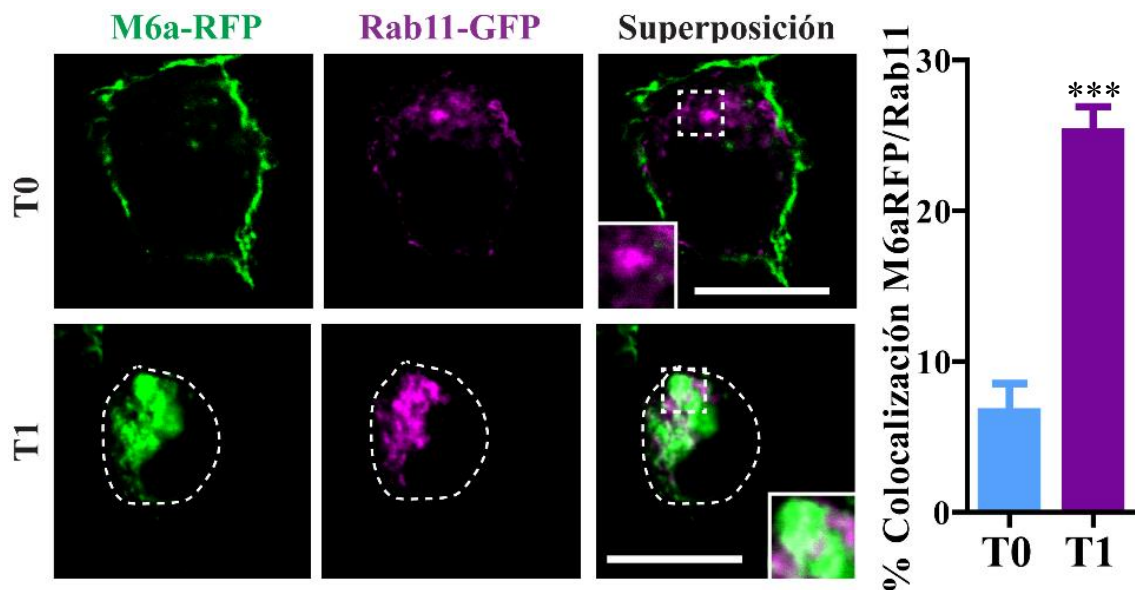


Figura 46: *M6a* endocitada es dirigida hacia endosomas de reciclado lento *Rab11* positivos en células HEK293. Imágenes representativas obtenidas por microscopía confocal de células HEK293. Éstas células coexpresaban M6a-RFP (se muestra en verde) y Rab11-GFP (se muestra en magenta) y fueron sometidas al AIA. Se observa en blanco el solapamiento de los canales a T1 comparando con T0. En la cuantificación se observa colocalización desde T0 ($6,65 \pm 1,88$, $n=20$), sin embargo a T1 ($25,25 \pm 1,68$, $n=22$; ***, $p<0,0001$) los valores aumentan significativamente. Las diferencias estadísticas fueron determinadas con el *Student's T-test* y fueron los valores graficados como la media + SEM. La escala es de 15 μm . Ampliación 4x4 μm .

M6a endocitada se encuentra en endosomas tardíos (Rab7 positivos) y del tipo degradativo (LAMP-1 positivos).

A partir de los endosomas tempranos característicos por Rab5, como ya se mencionó, se pueden generar endosomas de tipo tardíos característicos por tener a Rab7 en sus membranas. La GTPasa pequeña, Rab7, es requerida tanto para la progresión de endosomas tempranos hacia endosomas de tipo MVB como de tipo tardíos o degradativos (LE/Lys) (Vanlandingham and Ceresa, 2009).

Para evaluar si M6a endocitada forma parte de endosomas Rab7 de tipo tardíos decidimos coexpresar de forma transitoria M6a-RFP y Rab7-GFP en neuronas de hipocampo y células HEK293. Sometimos a ambos tipos celulares al AIA y obtuvimos imágenes representativas por microscopía confocal. En el caso de las neuronas de hipocampo maduras observamos superposición de M6a (que se observa en verde) y Rab7 (que se observa en magenta) a T1 (Figura 47). Esto se observa como partículas blancas en el panel de superposición donde se destaca en línea punteada una región blanca.

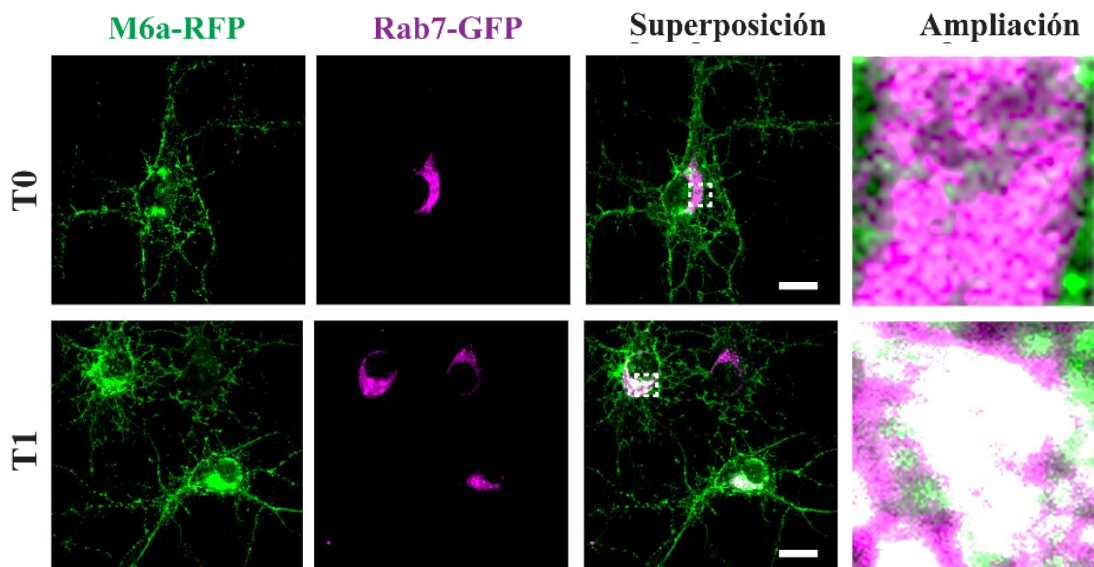


Figura 47: *M6a endocitada es dirigida hacia endosomas tardíos Rab7 positivos en neuronas de hipocampo.* Imágenes representativas obtenidas por microscopía confocal de neuronas de 15 DIV. Éstas células coexpresaban M6a-RFP (se muestra en verde) y Rab7-GFP (se muestra en magenta) y fueron sometidas al AIA. La escala es de 15 μm . Ampliación 4x4 μm .

Los resultados obtenidos en la línea HEK293 se muestran en la Figura 48. A T0, M6a se distribuye a lo largo de toda la superficie celular mientras que Rab7 forma parte de endomembranas. Esto se puede observar en el panel de superposición como marcas fluorescentes excluyentes. Esta observación cualitativa se ve reflejada en la cuantificación de colocalización. A T0 determinamos que M6a y Rab7 no colocalizan, sin embargo, a T1 se observó un aumento significativo en su colocalización ($p < 0,0001$).

Como se mencionó anteriormente una de las posibilidades es que los endosomas tardíos tipo Rab7 positivos maduren hacia endosomas degradativos. Una de las organelas típicamente degradativas y con pH ácido es el lisosoma, el cual se caracterizó por tener a LAMP-1 (Ciechanover, 2005). Dado que, describimos que M6a se encuentra en endosomas ácidos, marcados con el LysoTracker®, cómo siguiente paso nos propusimos analizar si parte de estos endosomas son LAMP-1 positivos.

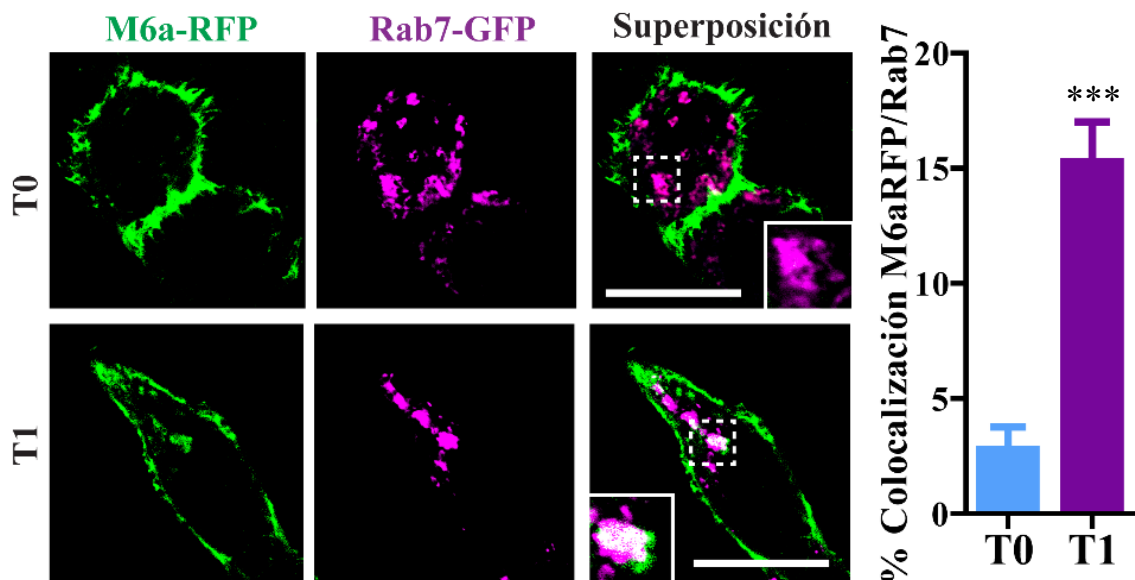


Figura 48: *M6a endocitada es dirigida hacia endosomas tardíos Rab7 positivos en células HEK293.* Imágenes representativas obtenidas por microscopía confocal de neuronas de 15 DIV. Estas células coexpresaban M6a-RFP (se muestra en verde) y Rab7-GFP (se muestra en magenta) y fueron sometidas al AIA. Se observa en blanco el solapamiento de los canales. En la cuantificación se puede observar que hay un aumento significativo en la colocalización de M6a y Rab7 a T1 ($25,27 \pm 1,73$, $n=22$) comparado con T0 ($2,80 \pm 0,98$, $n=20$; ***, $p<0,0001$). Las diferencias estadísticas fueron determinadas con el *Student's T-test* y fueron los valores graficados como la media + SEM. La escala es de 15 μ m. Ampliación 4x4 μ m.

Para esto nos propusimos estudiar células HEK293-M6a las ensayamos por el AIA. En la Figura 49 se muestran imágenes representativas de cada condición evaluada obtenidas por microscopía confocal. M6a se observa en verde y la inmunomarcación de LAMP-1 endógena se observa en magenta. Aquí se evidencia que a T1 hay vesículas en donde se superponen las señales de M6a y LAMP-1. Estas vesículas se observan de color blanco y una zona representativa se encuentra destacada en líneas de puntos. Cuando evaluamos la colocalización entre M6a y LAMP-1 endógena, observamos que a T1 hubo un aumento significativo de colocalización entre ambas proteínas comparado con T0 ($p<0,0001$).

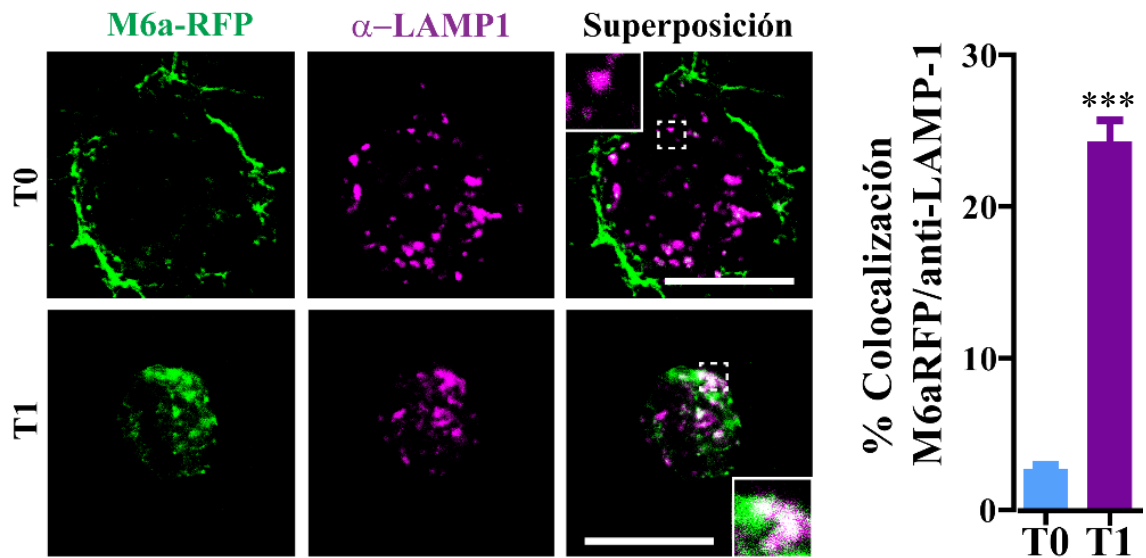


Figura 49: Una proporción de M6a endocitada se encuentra en endosomas LAMP-1 positivos. Imágenes representativas de cada condición ensayada de células HEK293 que sobreexpresaban M6a-RFP (se muestra en verde) y fueron sometidas al AIA. Luego del ensayo se fijaron las células y se incubaron con en anti-LAMP1 preparado en una solución 0,2 % de saponina durante toda la noche. Al día siguiente se incubó con un anticuerpo secundario anti ratón acoplado a Alexa 633 (se muestra en magenta). Las imágenes muestran un aumento en el solapamiento de ambas proteínas a T1 comparado con T0. En las cuantificaciones se observa que a T1 ($24,06 \pm 1,63$, $n=35$) hay un aumento significativo de colocalización de M6a y LAMP-1 comparado con T0 ($2,45 \pm 0,49$, $n=35$; ***, $p<0,0001$). Las diferencias estadísticas fueron determinadas con el *Student's T-test* y fueron graficados los valores como la media + SEM. Escala 15 μm . Ampliación 4x4 μm .

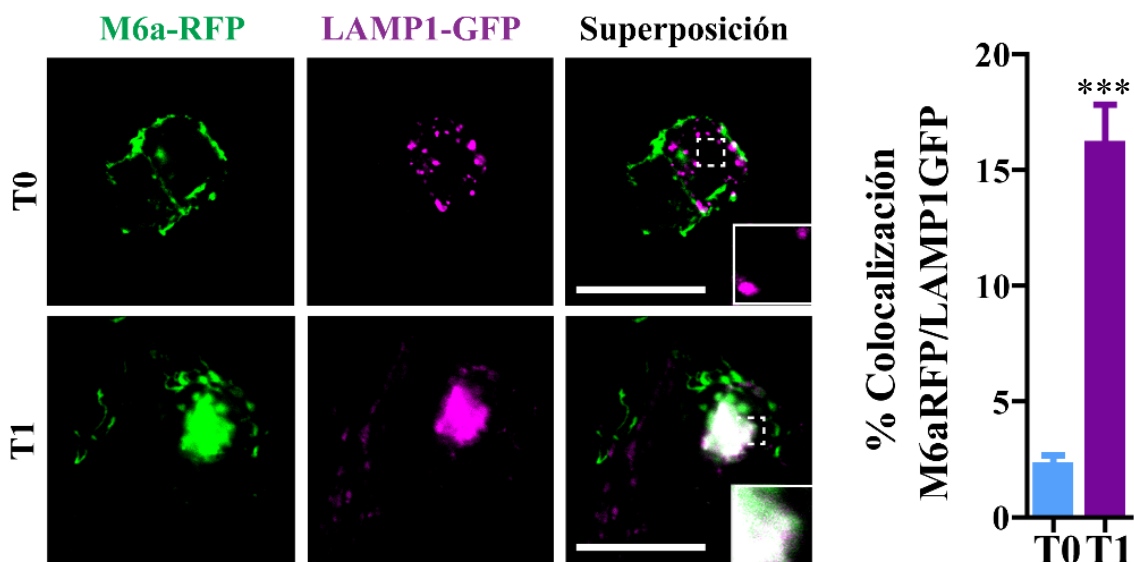


Figura 50: Una proporción de M6a endocitada se encuentra en endosomas LAMP-1 positivos cuando se las coexpresa. Imágenes representativas obtenidas por microscopía confocal de células HEK293 que coexpresaban M6a-RFP (se muestra en verde) y LAMP-1-GFP (se muestra en magenta) y fueron sometidas al AIA. Se analizó el porcentaje de colocalización y se observó que T1 ($16,13 \pm 1,68$, $n=30$) hay un aumento significativo de colocalización entre M6a y LAMP1-GFP comparado con T0 ($2,23 \pm 0,43$, $n=30$; ***, $p<0,0001$). Las diferencias estadísticas fueron determinadas con el T-test de Student y los valores fueron graficados como la media + SEM. Ampliación 4x4 μm . Escala 15 μm .

Obtuvimos resultados similares cuando se coexpresaron en forma transitoria M6a-RFP (que se muestra en verde) y LAMP-1-GFP (que se muestra en magenta) en células HEK293. Esto se observa en la Figura 50 como el solapamiento de las señales en las imágenes y se acompaña con un incremento estadísticamente significativo en la colocalización de ambas proteínas a T1 comparado con T0 ($p < 0,0001$) en el gráfico de barras. En conjunto, estos resultados sugieren que M6a se encuentra en endosomas tardíos tipo Rab7 positivos y que podrían dar lugar por maduración a endosomas de tipo lisosomas.

En esta sección estudiamos el destino subcelular de M6a durante la endocitosis. En primer lugar, descartamos el uso del fraccionamiento subcelular como método para identificar en qué compartimientos se encontraba M6a. En segundo lugar, en ensayos de sobreexpresión en neuronas y células HEK293 seguidos de inmunofluorescencia y microscopia confocal caracterizamos la vía endocítica de M6a. Determinamos que se reciclaría en endosomas Rab11 positivos. Es decir, M6a se recicla hacia la membrana plasmática por la vía lenta de reciclado. Pero no podemos descartar que una parte se recicle por la vía rápida de reciclado (Rab4) o bien sea liberada en exosomas ya que no lo hemos determinado. Además, M6a endocitada se detectó en endosomas tardíos Rab7 positivos y en lisosomas LAMP-1 positivos lo que sugiere que M6a podría estar sujeta a degradación.

Parte de M6a endocitada podría ser degradada.

En ensayos de citometría describimos la reducción en el porcentaje de M6a endógena en la superficie de neuronas de hipocampo, sometidas al AIA, lo que sugeriría su endocitosis. Además, una proporción de M6a endocitada se detectó en lisosomas LAMP-1 positivos. Teniendo todo esto en cuenta nos propusimos determinar si es que M6a endocitada podría ser degradada luego del AIA.

Para esto, neuronas de hipocampo de 15 DIV fueron sometidas al AIA. Posteriormente, se extrajeron las proteínas totales y se las ensayó por SDS-PAGE seguida de *Western blot*. La inmunodetección de M6a se realizó con un anticuerpo policlonal que reconoce el extremo C-terminal desarrollado en el laboratorio. Este ensayo nos permitió detectar M6a total a T0, T1 y WO_{20h} como bandas simples o dobles de aproximadamente 32-35 kDa como ya se ha descripto en bibliografía (Fuchsova, y col., 2009, Scorticati, y col., 2011, Formoso, y col., 2015b). También inmunodetectamos como control de carga a α -tubulina, como ya se explicó, para poder hacer las relativizaciones correspondientes. En la Figura 51A se muestra un *Western blot* representativo, pero realizamos este experimento por triplicado con muestras biológicas independientes. Al realizar la cuantificación de la abundancia de M6a dependiendo de la

condición analizada nos basamos en la intensidad de pixeles obtenidos para M6a con el *software* ImageJ relativizados a los valores obtenidos para tubulina. En este caso no obtuvimos diferencias significativas en la abundancia de M6a en las condiciones evaluadas (Figura 51B).

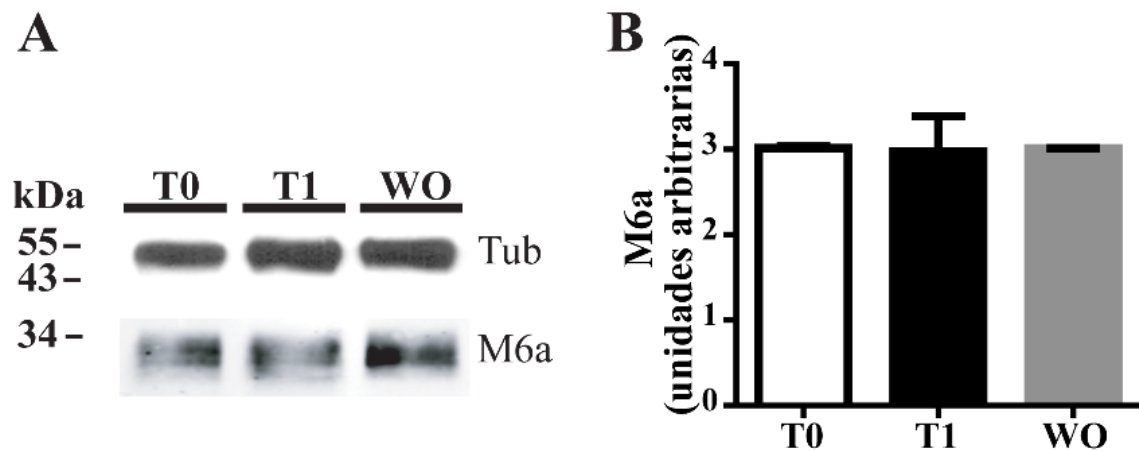


Figura 51: Los niveles de M6a en neuronas de 15 DIV sometidas al AIA no se modifican. Cultivos de neuronas de 15 DIV fueron sometidos al AIA con el WO_{20h}. Luego las células fueron recolectadas y procesadas para extracción de proteínas totales. **A.** Se separaron por SDS-PAGE seguido por *Western blot* iguales cantidades de proteínas de cada condición. Se utilizaron los anticuerpos anti-M6a C-terminal policlonal (1:1000) y α -tubulina (1:1000) y se observan bandas del peso molecular predicho para ambas proteínas. **B.** Al menos tres experimentos independientes fueron realizados. Se cuantificaron las intensidades de pixeles de M6a y se lo relativizó a los valores de tubulina con el ImageJ. Se representa como unidades arbitrarias en el gráfico. Al comparar las distintas condiciones experimentales no se detectaron diferencias significativas.

Decidimos ensayar la cantidad de M6a total en células HEK293 transfectadas transitoriamente con M6a-GFP. Sometimos estas células al AIA en presencia de cicloheximida para prevenir la síntesis de nuevas proteínas y se mantuvo a lo largo del WO_{4h}. Esto nos permitió ensayar de forma controlada la abundancia de M6a-GFP total en las células. Luego del AIA preparamos una alícuota de células para *Western blot* y otra alícuota para citometría de flujo. En la Figura 52A se muestra un *Western blot* representativo. Para la inmunodetección de M6a-GFP utilizamos un anticuerpo policlonal que reconoce a GFP. En el caso de M6a-GFP el tamaño esperado es de alrededor de 55 kDa. Determinamos que tanto a T0 como a T1 la abundancia total de M6a-GFP era similar. Sin embargo, la condición WO mostró una reducción significativa ($p < 0,05$) de la abundancia de M6a-GFP comparada con T0 y T1 como se muestra en la Figura 52B. Estos resultados indicarían que M6a en el período de T1 al WO_{4h} podría ser degradada.

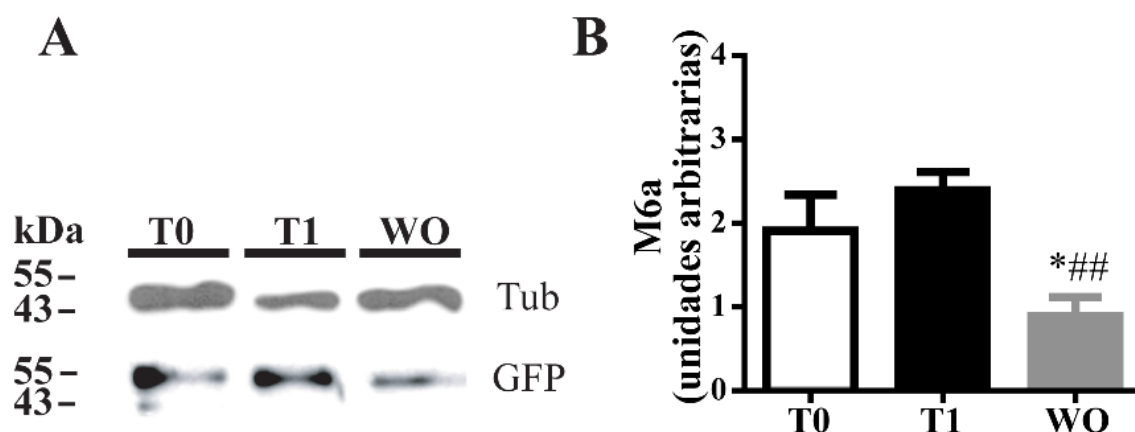


Figura 52: La concentración de M6a total disminuye en células HEK293 sometidas al AIA evaluado por *Western blot*. Células HEK293 que sobreexpresaban M6a-GFP fueron sometidas al AIA. Durante el WO_{4h} el medio fue suplementado con cicloheximida para prevenir la nueva síntesis proteica. **A**. Se realizó la inmunodetección con anti-GFP (1:1000) y α -tubulina (1:1000) como control de carga. **B**. La cuantificación de la intensidad de píxeles fue realizada con ImageJ para GFP y fue relativizada a los valores obtenidos para tubulina. Este ensayo fue realizado por triplicado y se muestran los valores como unidades arbitrarias en función de la condición evaluada. El gráfico representa la media + SEM. Las diferencias significativas fueron determinadas por ANOVA de un factor seguido de la prueba de Bonferroni. $F(2,6)=14.01$, $p=0,0055$; * $p<0,05$, T0 vs. WO_{4h} y *** $p<0,01$, T1 vs. WO_{4h} (n=3).

El análisis de las células HEK293-M6a-GFP reservadas para citometría de flujo fue con células mantenidas intactas y fijadas. Se evaluó su integridad por microscopia de campo claro y de fluorescencia. Con esta alícuota de células cuantificamos la intensidad de fluorescencia observada en el canal FL1 (fluorescencia verde) en función de los eventos colectados (células HEK293). En la Figura 53A se muestran los histogramas representativos de una réplica. Utilizamos células no transfectadas para decidir el punto de corte entre la autofluorescencia y las células que son GFP positivas (<1 % de las células totales evaluadas). Tomamos a la cantidad de M6a-GFP total a T0 como el 100 % y relativizamos las demás condiciones a ésta. En la Figura 53B se muestra el porcentaje de M6a total de tres experimentos independientes en función de la condición evaluada. Se puede observar, que al igual que en el ensayo de *Western blot*, no hay diferencias entre T0 y T1. Por el contrario, cuando analizamos el WO_{4h} hubo una reducción del 25 % aproximadamente en la cantidad de M6a-GFP, comprada con T0 y T1 ($p<0,05$) (Figura 53B).

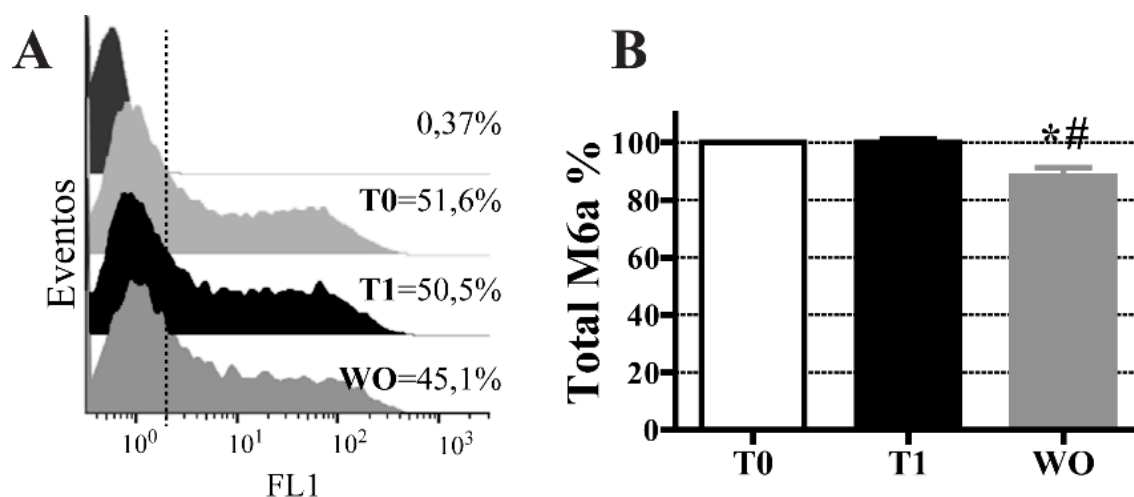


Figura 53: La concentración de M6a total disminuye en células HEK293 sometidas al AIA evaluado por citometría de flujo. Células HEK293 que sobreexpresaban M6a-GFP y tratadas con el AIA fueron analizadas por citometría de flujo. **A.** Histogramas representativos de un experimento independiente que representa la cantidad de eventos en función de la fluorescencia (verde) en el canal FL1 se muestran en el panel A. Se observan los porcentajes obtenidos de intensidad de fluorescencia a partir de la línea punteada hacia la derecha (punto de corte 1 %>). Estos valores representan la fluorescencia asociada a M6a-GFP total. **B.** Cuantificación de tres experimentos independientes relativizados, cada uno, a la fluorescencia detectada para T0 tomada como el 100 %. El gráfico representa la media + SEM para cada condición evaluada. Las diferencias significativas fueron determinadas por ANOVA de un factor seguido por la prueba de Bonferroni. $F(2,6)=13.33$; $P=0,0062$; $*/\#p<0,05$, T0 vs. WO_{4h} y T1 vs. WO_{4h} (n=3).

En esta sección pusimos de manifiesto que no hubo variación en la abundancia relativa de M6a luego del AIA en neuronas de hipocampo de 15 DIV por *Western blot*. Sin embargo, en condiciones controladas de expresión de M6a en células HEK293 observamos que parte de M6a se pierde durante el AIA. Estos resultados nos permiten especular que de forma contraria a lo que sucede con PLP, M6a utilizaría a los endosomas LAMP-1 positivos para su degradación. Sin embargo, se ha reportado que M6a, al igual que PLP (Trajkovic, y col., 2008), es capaz de formar parte de exosomas (Monteleone, y col., 2017) y de esta manera también se justifica una disminución en la cantidad total de la proteína.

DISCUSIÓN

En la introducción describimos el rol protagónico de M6a en la plasticidad neuronal estructural relacionándola positivamente con la diferenciación neuronal, la extensión de neuritas, la formación de filopodios, la formación y mantenimiento de espinas y sinapsis (Figura 3) (Lagenaur, y col., 1992, Alfonso, y col., 2005a, Fuchsova, y col., 2009, Brocco, y col., 2010, Formoso, y col., 2015a, Formoso, y col., 2015b, Alvarez Julia, y col., 2016, Formoso, y col., 2016, Ito, y col., 2018). También hemos destacado la vinculación de M6a con desórdenes neuropsiquiátricos humanos. Como ser, la duplicación de *GPM6A* en un niño produjo fallas en su aprendizaje y retardo mental mientras que la presencia de SNPs en regiones no codificantes se la relacionó con la esquizofrenia, depresión, depresión bipolar y la claustrofobia (Boks, y col., 2008, Greenwood, y col., 2012, El-Kordi, y col., 2013, Gregor, y col., 2014). También hemos destacado que la endocitosis en células neuronales es esencial durante el desarrollo neuronal y para llevar a cabo sus funciones. En este sentido, las alteraciones de los mecanismos endocíticos cumplen un rol central en la fisiopatología de determinadas enfermedades neurodegenerativas (Parton and Dotti, 1993, Cosker and Segal, 2014, Cousin, 2015). Si bien son pocos los ejemplos que vinculan a M6a con distintos desórdenes neuropsiquiátricos, su participación en la plasticidad neuronal a lo largo del desarrollo neuronal la destacan entre las proteínas que podrían influir en su patología.

Además, hemos mencionado distintos aspectos en la estructura de M6a asociados a su función. En particular, estudios focalizados en el EC2 de M6a, han destacado su relevancia señalando la posible modulación de los efectos plásticos de la proteína. Como ser el bloqueo de la extensión de neuritas por la presencia de un anticuerpo monoclonal que reconoce al EC2. Sumado a que, la mutagénesis sitio dirigida a 2 de las 4 cisteínas presentes en el EC2, que forman un puente disulfuro, provocó la disminución de la formación de filopodios y la pérdida del reconocimiento antigénico (Lagenaur, y col., 1992, Fuchsova, y col., 2009). Por otro lado, en nuestro laboratorio se ha descrito que M6a particiona en microdominios de membrana tipo *lipid raft* (Scorticati, y col., 2011). Otro estudio ha demostrado, por coinmunoprecipitación de M6a, que interacciona directa o indirectamente con la cadena pesada de clatrina (Fuchsova, y col., 2015). Estos estudios señalan que M6a se podría internalizar tanto por la EIC como la EMC. Sin embargo, hasta el momento no se había indagado sobre un posible mecanismo de endocitosis y reciclado para M6a y las consecuencias funcionales que esto pueda tener. Nuestra hipótesis es que las funciones de M6a, al igual que las TTs, están comandadas por señales que recibe a través de su bucle extracelular mayor (EC2). Sumado a que M6a tiene un sistema de endocitosis y reciclado que le permite a la neurona regular su concentración en la membrana. De esta forma puede redirigir a M6a hacia donde su función sea requerida y así modula la

plasticidad neuronal.

En esta sección se discutirán los principales hallazgos de este trabajo donde estudiamos las posibles vías de endocitosis y reciclado de M6a en neuronas de hipocampo inmunoestimuladas con el anti-M6a-mAb y sus consecuencias funcionales. Ante dicho estímulo parte de M6a se endocita y esto se acompaña con la disminución del número de sinapsis. Además, describimos que la endocitosis de M6a es exclusivamente por la vía de EMC. Luego, una parte de M6a endocitada, se recicla hacia la membrana celular por la vía lenta de reciclado (Rab11). No obstante, una parte, de M6a endocitada, no vuelve a la membrana plasmática. Identificamos que la tirosina 251, que forma parte del motivo basado en tirosina ²⁵¹YEDI²⁵⁴, ubicado en el extremo C-terminal de M6a es necesaria para su internalización dependiente de vesículas revestidas por clatrina. Posiblemente este motivo sería el responsable de la interacción de M6a con AP-2/clatrina. Sumado a esto, encontramos que otra parte de M6a endocitada se dirige hacia endosomas tardíos (Rab7) y una parte podría ser degradada en endosomas LAMP-1 positivos. Sin embargo, debemos considerar que la disminución documentada de M6a podría ser por otras vías que no han sido exploradas.

Hasta el momento no se han descripto ligandos endógenos que interactúen y modulen la actividad de M6a. Sin embargo, existen reportes que destacan la relevancia funcional del EC2 de M6a (Lagenaur, y col., 1992, Fuchsova, y col., 2009, Sato, y col., 2011a, Formoso, y col., 2015a). La utilización anticuerpos monoclonales que reconocen los dominios extracelulares de proteínas de membrana, cuyos ligandos se desconocen, son una buena herramienta para estudiar las vías de internalización, destino subcelular y su reciclado (Pula, y col., 2005). Es el caso de PLP que se ha utilizado un anticuerpo monoclonal, el cual reconoce su porción extracelular, en un cultivo primario de oligodendrocitos. De este modo, los autores lograron hacer un seguimiento de la endocitosis de PLP durante su tráfico intracelular (Winterstein, y col., 2008). Un caso similar es el del receptor de neurotrofinas p75, que al ser expuesto al anti-p75, que reconoce su porción extracelular, y permitió a los investigadores monitorear el su endocitosis en un modelo de células HEK293 (Escudero, y col., 2014). Para el caso de M6a, existe un antecedente donde tratan a células HEK293-M6a con un anticuerpo monoclonal 1B4, que reconoce una porción del EC2. Los autores encuentran parte de M6a en compartimientos endosomales tempranos, sugiriendo su endocitosis (Sato, y col., 2011b). En este trabajo de tesis hemos documentado, tanto por inmunofluorescencia como por citometría de flujo, que el tratamiento con el anti-M6a-mAb aplicado en neuronas hipocampales induce la endocitosis de M6a. Adicionalmente, observamos que M6a luego de retirado el estímulo (WO) recupera su localización en la membrana plasmática. Sin embargo, una parte de M6a se pierde durante el

proceso. Más aún, con la sobreexpresión de M6a tanto en neuronas como en células HEK293 encontramos un comportamiento endocítico similar frente la inmunoestimulación.

En este trabajo de tesis describimos por primera vez que M6a ante el tratamiento con el anti-M6a-mAb, que interacciona con el EC2, es endocitada. Datos no publicados del laboratorio dan cuenta que para el reconocimiento antigénico de M6a por parte del anti-M6a-mAb se requieren ambos bucles extracelulares (EC2 y EC1). En concordancia, Sato y colaboradores han probado que para el reconocimiento antigénico con el anti-M6a-1B4 también es necesario la presencia de los dos bucles extracelulares de M6a (Sato, y col., 2011b). De forma similar a lo que ocurre con las TTs, creemos que el anti-M6a-mAb reconoce al EC2 y necesita la asistencia del EC1 para fortalecer la unión. Particularmente, en el EC2 de las TTs se encuentra una región hipervariable e inmunodominante (Stipp, y col., 2003). En concordancia, si bien M6a no es una TT, se reconoce que las funciones de las TTs se encuentran comandadas por señales que reciben a través de su EC2, de forma similar a lo observado para M6a. Además, se conoce que las TTs forman redes organizadas TEMs en donde interaccionan consigo mismas, con lípidos y otras proteínas y les sirven de plataforma de señalización (Kovalenko, y col., 2007, Hemler, 2008, Rajesh, y col., 2012). De forma análoga, parte de M6a reside en los *lipid rafts* en dónde puede interaccionar lateralmente consigo misma, con el colesterol, y otras proteínas residentes (*e.g.* Src-quinasa). Sugiriendo que los *lipid rafts* funcionarían como plataforma de señalización para M6a de forma similar a lo que ocurre con las TEMs (Scorticati, y col., 2011). Teníamos indicios de que los bucles extracelulares de M6a son críticos para su función. Además, se demostró que estas cisteínas participan de la formación de filopodios y de los clústeres de sinaptofisina (Fuchsova, y col., 2009). En conjunto estos antecedentes refuerzan la idea de que el EC2, de modo similar a lo que ocurre con las TTs, comanda la función plástica de M6a en las neuronas.

En un sentido similar, en el año 1992 Lagenaur y colaboradores han demostrado que la adición del anti-M6a-mAb en cultivos de neuronas cerebelares bloqueó la extensión de neuritas. Es por esto que lo denominaron anticuerpo neutralizante (Lagenaur, y col., 1992). Otros aportes generado en nuestro laboratorio han demostrado que el anticuerpo neutralizante bloquea la extensión de neuritas en neuronas hipocampales y células N2a que sobreexpresan M6a en cultivo (Formoso, y col., 2015a). Estudios de otros autores han mostrado que el tratamiento neutralizante, con el anti-M6a-mAb y con el anti-M6a-1B4, produce el arresto del crecimiento axonal. Sumado a esto, se ha descripto que M6a se retira de la membrana del cono axonal ante el estímulo neutralizante (Sato, y col., 2011a). Estos antecedentes, también, aportan sustento a la relevancia de la modulación de M6a a través de la estimulación de su EC2.

Este trabajo de tesis describe por primera vez que la endocitosis de M6a podría ser la causa de las consecuencias funcionales producidas por el anti-M6a-mAb. Se propone que la endocitosis de M6a en neuronas de hipocampo y en células HEK293-M6a-GFP/RFP, mediante la adición del anticuerpo neutralizante, produjo la disminución de la cantidad de M6a en la superficie celular. Esto último se asocia con la disminución de las sinapsis para el caso de cultivos primarios de neuronas. Nuestros resultados indican que luego del WO M6a se localiza en la membrana, sin embargo, una parte de la proteína se pierde durante el proceso. Esto último se evidencia en los experimentos de citometría de flujo, donde observamos que el 80 % de M6a se recupera en la membrana de neuronas hipocampales. Notablemente, la restitución de M6a en la membrana, aunque no fuera completa, resultó ser suficiente para restablecer el número de sinapsis con valores similares a T0. En un sentido similar, estudios anteriores del laboratorio han demostrado que la reducción en la expresión de M6a, de aproximadamente el 60 % del mRNA, produjo no sólo la reducción de la densidad de filopodios sino que también la de clústeres de sinaptofisina en neuronas hipocampales maduras (9-11 DIV) (Alfonso, y col., 2005a). Sumado a todo esto, en un estudio previo describimos que M6a es parte de las sinapsis colocalizando con clústeres de sinaptofisina y NMDA-R1 (Formoso, y col., 2016). Además, en trabajos previos documentamos que la sobreexpresión de M6a en neuronas hipocampales promueve la espinogénesis y la sinaptogénesis de forma significativa. Mientras que neuronas que sobreexpresaban variantes génicas de M6a, SNP1 (rs11545190, F93C) y SNP2 (rs11729990, I97S), que han demostrado tener una disminución en la interacción homotípica, tuvieron valores similares al control (neuronas que expresaban M6a endógena) (Formoso, y col., 2015b, 2016). En base a lo antes expuesto, podríamos especular que los niveles de M6a en la superficie neuronal tendrían valores críticos o umbrales que le permitiría modificar el número de sinapsis según sea requerido. Una de las líneas de nuestro laboratorio, en la que participa la Lic. Gabriela Aparicio, se concentran en la búsqueda de ligandos, o moléculas, que interactúe con los bucles extracelulares de M6a. Estos posibles ligandos podrán ofrecer una herramienta de estudio que permita la estimulación o el bloqueo de las funciones plásticas de M6a independizándonos de la sobreexpresión.

En este trabajo de tesis hemos descripto que la disminución de la cantidad de sinapsis luego de la endocitosis de M6a no se debió a la degradación de los componentes sinápticos (en los tiempos estudiados) sino que, probablemente, a su deslocalización. Hace algunos años se comenzó a estudiar si la formación y mantenimiento de clústeres de proteínas sinápticas podrían estar relacionados con los estímulos que recibe la neurona desde el exterior o bien con la interacción con componentes celulares. En el caso de la enfermedad de Alzheimer se ha

descripto que existen efectos tempranos relacionados a la disfunción sináptica. En un modelo de neuronas corticales en cultivo han simulado los efectos tempranos de la enfermedad. Para ésto trataron a los cultivos con el β -amiloide₁₋₄₀ y observaron que los clústeres de proteínas post sinápticas homero, shank y mGluR1 disminuyen. En este trabajo demostraron que la disminución en el área y densidad de los clústeres de homero, shank y mGluR1 no se debió a su degradación sino a su deslocalización, al igual que nosotros hemos sugerido para sinaptofisina y NMDA-R1 (GluN1) (Roselli, y col., 2009). Teniendo en cuenta estos antecedentes, nuestros hallazgos podrían justificarse por la deslocalización de los componentes sinápticos. Esto es porque a los tiempos experimentales evaluados no encontramos diferencias en la abundancia de sinaptofisina ni de NMDA-R1.

Se ha reportado que una de las funciones principales de las espinas dendríticas es la compartimentalización local de la señalización y la restricción de la difusión de las moléculas post sinápticas. Las espinas son protrusiones de membrana que emergen de las dendritas post sinápticas y de la mayoría de las sinapsis excitatorias. Se sabe que cambios en el tamaño y forma de las espinas correlacionan con la fuerza de las conexiones sinápticas excitatorias. Estos cambios de la morfología de las espinas son fuertemente dependientes del citoesqueleto de actina y la composición de la zona post sináptica densa (PSD). En las sinapsis el citoesqueleto de actina no solo juega un rol importante en la estructura sino que también juega un rol importante en las actividades sinápticas organizando la PSD (Sekino, y col., 2007, Hotulainen and Hoogenraad, 2010). Particularmente, se acepta que hay una estrecha relación entre la sinaptogénesis y la espinogénesis (Yuste and Bonhoeffer, 2004). En este trabajo de tesis nosotros documentamos que el tratamiento neutralizante (anti-M6a-mAb) disminuyó el número de sinapsis por unidad de dendrita. Este hallazgo podría estar relacionado con el rearrreglo de los componentes post sinápticos. Este rearrreglo podría deberse a la modificación del citoesqueleto de actina que es lo que le permite a las neuronas la modificación de la forma y tamaño de las espinas y por consiguiente de las sinapsis. En este aspecto, en un trabajo previo hemos demostrado que la sobreexpresión de M6a no solo aumenta el número de sinapsis sino que también aumenta la cantidad de espinas por unidad de dendrita (Formoso, y col., 2016). Vinculando los resultados obtenidos en esta tesis con la bibliografía, se sabe que uno de los efectos producidos en las células eucariotas que endocitan moléculas de membrana es el posible rearrreglo del citoesqueleto de actina (Smythe and Ayscough, 2006). En el caso de M6b, se ha descripto que su silenciamiento en células humanas mesenquimales, diferenciadas a osteoblastos, mostró cambios pronunciados en la organización del citoesqueleto de actina. Los autores postulan que M6b en sus extremos citoplasmáticos tienen sitios predichos para la

interacción con el citoesqueleto de actina, lo que podría explicar la desorganización observada (Drabek, y col., 2011). Para el caso de M6a sabemos que interactúa con coronina 1a, en la yuxtamembrana, siendo ésta una proteína que interactúa con el citoesqueleto de actina (Alvarez Julia, y col., 2016). Estos últimos antecedentes sugerirían que M6a al endocitarse podría, mediante su desacople con coronina 1a, causar un rearrreglo en el citoesqueleto de actina. De esta forma se podría en parte explicar la disminución de la cantidad de sinapsis luego del tratamiento neutralizante. Sin embargo, estudios de Sato y colaboradores han mostrado que el tratamiento de células que sobreexpresaban M6a con lantrunculina B, un despolimerizador de actina, no mostraron alteraciones en la distribución en la membrana de M6a. En este aspecto, estos autores también mostraron que el tratamiento tanto con el anti-M6a-mAb como con el anti-M6a-1B4 no modificó el citoesqueleto de actina, pero si provocó el bloqueo del crecimiento axonal (Sato, y col., 2011a, Sato, y col., 2011b). En otras palabras, la deslocalización de M6a observada por Sato y colaboradores en el axón no estaría relacionada al rearrreglo del citoesqueleto de actina. Sin embargo, hay vasta bibliografía que apoya la idea de que al variar las concentraciones de M6a se producen rearrreglos del citoesqueleto durante la diferenciación neuronal. Acompañan a este posible rearrreglo las consecuencias plásticas, como ser la formación de filopodios que se ha documentado en nuestro laboratorio (Alfonso, y col., 2005b, Fuchsova, y col., 2009, Brocco, y col., 2010, Fernandez, y col., 2010, Scorticati, y col., 2011, Monteleone, y col., 2014, Formoso, y col., 2015a, Alvarez Julia, y col., 2016). La participación de M6a en la espinogénesis sugiere fuertemente que M6a de alguna manera induce el rearrreglo del citoesqueleto de actina.

Teniendo en cuenta los resultados descriptos del tránsito endocítico de M6a, generado por el anti-M6a-mAb y las consecuencias funcionales en esta tesis, se evaluó esto mismo en un modelo murino *in vivo*. Esto lo hicimos en colaboración con el laboratorio de Neurofarmacología de los Procesos de Memoria, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA a cargo del Dr. Mariano Boccia. Se evaluó las consecuencias comportamentales y moleculares que podría producir la administración del anti-M6a-mAb en el hipocampo en un modelo de ratones CF1. Los estudios de memoria han sido realizados en dispositivos tipo *passive avoidance step-trough* con un estímulo eléctrico moderadamente fuerte. Inmediatamente después del entrenamiento se realizó la administración del anticuerpo neutralizante y un control de isotipo. Luego de 48 horas los animales fueron testeados. Los estudios preliminares, han demostrado una relación dosis dependiente del deterioro de la memoria con la dosis del anti-M6a-mAb siendo necesario administrar 30 ng por hemihipocampo. Asimismo, la administración del control de isotipo no generó alteraciones en

el comportamiento. Este deterioro en la memoria se observó mediante la disminución de los tiempos de latencia de los animales conforme aumentó la dosis de anticuerpo. Esto indicaría un posible deterioro en el establecimiento o bien en la evocación de la memoria provocado por la interacción específica del anti-M6a-mAb con M6a. Luego del testeo, se sacrificaron los animales, y se realizaron cortes histológicos para evaluar el número de sinapsis en área CA1 del hipocampo. Se observó, en concordancia a lo obtenido *in vitro*, una reducción significativa de la cantidad de clústeres sinápticos (sinaptofisina y NMDA-R1) así como también una reducción del número de sinapsis. Estos estudios señalan la primera evidencia *in vivo* de que el bloqueo agudo de M6a en el hipocampo afecta un proceso fisiológico. Si bien hasta el momento no se han hecho estudios de memoria en la bibliografía que involucren a M6a, estudios comportamentales de ratones *knock out* de M6a no han mostrado diferencias con ratones silvestres. A excepción de la aparición de un fenotipo claustrofóbico luego de estrés moderado (El-Kordi, y col., 2013, Mita, y col., 2015). Estos resultados en conjunto señalan que la ausencia de M6a en superficie neuronal fue compensada a lo largo del desarrollo del individuo y por ello no muestran fenotipo. Distinto es el caso de la disminución aguda de M6a, mediante la aplicación del anti-M6a-mAb en ratones adultos, ya que no hay posibilidades de compensación. Esto podría explicar, en parte, el detrimento de la memoria en los animales adultos por la deslocalización aguda de M6a en el hipocampo.

Este defecto en la memoria de los animales se acompaña con disminuciones de las sinapsis en el hipocampo, como ya se mencionó, lo que muestra que los estudios de esta tesis podrían ayudar a entender los mecanismos fisiológicos en los que M6a participa en un individuo. En conjunto todos estos resultados nos permiten especular que la concentración de M6a en la superficie neuronal podría actuar como un modulador de la plasticidad neuronal. Siendo ésta, positiva o negativa y dependiente de las moléculas endógenas que se asocien a los extracelulares y las etapas del desarrollo neuronal (intra o extrauterino). En apoyo, resultados de nuestro laboratorio indican que los niveles de M6a aumentan en la superficie de neuronas entre 1-15 DIV (Formoso, y col., 2016) y en muestras de hipocampo, corteza prefrontal y cerebelo de ratas desde el día del nacimiento (P0) hasta la edad juvenil (P28), datos no publicados, donde permanecen constantes hasta la adultez (aunque ligeramente disminuidos).

En mamíferos se ha estudiado que durante el desarrollo y en la adultez, los cambios en el número de espinas dendríticas y su morfología acompañan a la formación de sinapsis. Su mantenimiento y/o la eliminación, en un proceso denominado *pruning* o podado sináptico. Una falla en el podado, ya sea falta o exceso, está relacionada con enfermedades neuropsiquiátricas como ser los trastornos del espectro autista, la esquizofrenia y la enfermedad de Alzheimer

(Penzes, y col., 2011). En este sentido, se podría especular que el podado sináptico adecuado, en el desarrollo de un individuo, podría estar relacionado con la correcta expresión de M6a y presencia de sus sustratos naturales. Siguiendo con este razonamiento, la deslocalización endocítica, las mutaciones o variantes génicas, o fallas en el plegamiento de M6a también podrían estar implicadas en la falla del podado sináptico. Estos aspectos aún no han sido dilucidados lo que abre las puertas a un variado repertorio de interrogantes por contestar.

Datos bibliográficos indican que M6a se encuentra parcialmente localizada en dominios tipo *lipid raft* (Scorticati, y col., 2011, Honda, y col., 2017a, Ito, y col., 2018), lo que indicaría su endocitosis por la EIC. Otros reportes han señalado que M6a coinmunoprecipita con la cadena pesada de clatrina lo que indicaría su endocitosis por la EMC (Fuchsova, y col., 2015). En este trabajo de tesis probamos por primera vez que la glicoproteína de membrana M6a se endocita exclusivamente por la EMC luego de la estimulación con el anti-M6a-mAb. Existen reportes que han documentado que, de forma similar a lo que ocurre con M6a, el receptor de neurotrofina p75 particiona en dominios tipo *lipid raft* en neuronas hipocampales. Sin embargo, luego de la estimulación de NGF o de BDNF el receptor se internaliza por la EMC de forma similar a lo que nosotros hemos descrito para M6a (Deinhardt, y col., 2007). Nuestros estudios se encuentran en concordancia con los trabajos de Liu y Wu que describieron que la internalización del MOPr y M6a fue bloqueada en presencia de una solución hipertónica de sacarosa que inhibe la EMC (Wu, y col., 2007, Liang, y col., 2008). Nosotros describimos la inhibición de la endocitosis en presencia de metil- β -ciclodextrina y monensina dos inhibidores de la EMC y no así por filipina. En contraste, la endocitosis de PLP se vio bloqueada en presencia de filipina lo que prueba que PLP, que reside en *lipid raft*, es endocitada por la vía de caveola/*raft* (Winterstein, y col., 2008). Numerosos reportes han situado a los motivos lineales que una proteína pueda tener como indicadores de distintos procesos celulares como ser, palmitoilación, N-glicosilación, fosforilación, endocitosis, entre muchos otros (Ribet and Cossart, 2010). En este aspecto, en esta tesis describimos la relevancia del motivo basado en tirosina ²⁵¹YEDI²⁵⁴ en el extremo C-terminal de M6a (predicha por el ELM (<http://elm.eu.org/>)). Datos bibliográficos han resaltado que los aminoácidos centrales del motivo (ED) podrían generar, además, el direccionamiento de la molécula endocitada hacia un tipo particular de endosoma como ser el lisosoma (Bonifacino and Dell'Angelica, 1999, Pandey, 2009, Cosker and Segal, 2014, Robinson, 2015). Estudios anteriores del laboratorio sitúan a la tirosina 251 como un sitio de fosforilación. Como ya hemos mencionado, la sobreexpresión de M6a produce neuritogénesis y aumento de la extensión de neuritas, mientras que el tratamiento con el anti-M6a-mAb la bloquea. Para evaluar la relevancia de la Y251 se generaron dos

mutantes que reemplazaron la tirosina por una alanina, lo que genera un sitio no fosforilable (Y251A), o por un D-aspartico, lo que genera un sitio fosfomimético (Y251D). Adicionalmente, la Y251A bloqueó la extensión de neuritas mientras que, de forma contraria, la Y251D generó la extensión de neuritas de modo similar que M6a silvestre. Lo llamativo fue que la Y251D en presencia del anti-M6a-mAb fue capaz aún de extender neuritas de modo similar que M6a silvestre en ausencia del estímulo neutralizante (Formoso, y col., 2015a). Con los datos obtenidos en este trabajo de tesis, podemos asegurar que la falta de inhibición de la extensión de neuritas en células que expresan Y251D en presencia del anti-M6a-mAb se debió a la ruptura del motivo lineal de tirosina. Dos efectos que actuarían de forma sinérgica, además de saltar la estimulación del anticuerpo neutralizante la Y251D se encuentra persistentemente activa en la membrana plasmática lo que favorecería su actividad. De hecho al ensayar células que sobreexpresaban Y251A, que también elimina el motivo lineal, expuestas al AIA observamos el bloqueo total de la endocitosis de M6a. En un sentido similar, en el laboratorio utilizando una mutante truncada de M6a-ΔC-terminal, lo que elimina el motivo de tirosina ²⁵¹YEDI²⁵⁴, se documentó una reducción de la colocalización con clatrina (Rosas, y col., 2018). Estos resultados en conjunto nos permiten especular que el motivo basado en tirosina en el que la Y251 participa podría interaccionar con AP-2, lo que recluta a clatrina, y de este modo endocita a M6a por la EMC.

Realizamos el análisis de los motivos lineales que se encuentran presentes en las secuencias de las proteínas PLP1 y M6b con la base de datos ELM. Al analizar la secuencia de PLP1 no se observaron motivos de endocitosis de la EMC, mientras que para M6b se observó el motivo basado en tirosina ²³¹YAVL²³⁴ en su extremo C-terminal. Si bien, hasta el momento, no se ha determinado la vía de endocitosis de M6b, el motivo basado en tirosina en su C-terminal, sugiere que, de modo similar a M6a, podría endocitarse por la EMC. De modo contrario, PLP1 no posee motivos que predigan la EMC lo que se encuentra en concordancia con hallazgos previos que indican que su vía de endocitosis es la EIC. La presencia y ausencia de motivos lineales que permiten predecir la EMC, como lo es el motivo basado en tirosina, podría en parte explicar el comportamiento endocítico distintivo entre M6a y PLP1.

Anteriormente, como resultados de esta tesis, hemos destacado que M6a en presencia del estímulo neutralizante no sólo se endocita sino que luego del WO (WO_{4h} o WO_{20h}) recupera su localización en la superficie celular. Sin embargo, parte de M6a endocitada se pierde durante el WO, como ya hemos señalado. El trabajo de Liang y colaboradores han detectado a M6a y al MOPr en endosomas de tipo reciclado Tf y Rab 11 positivos. En el modelo experimental que ellos estudiaron, sobreexpresaron en células HEK293-M6a-MOPr de forma estable. Estas

células fueron incubadas con el anti-M6a-mAb en frío y posteriormente estimuladas con un antagonista del MOPr, DAMGO, a 37°C (Liang, y col., 2008). Si bien en los estudios de Liang y colaboradores se otorga a M6a la facilitación de la endocitosis y reciclado del MOPr exclusivamente con el estímulo del antagonista DAMGO en este diseño experimental no es tenido en cuenta el efecto del anti-M6a-mAb. En esta tesis se ha demostrado que la presencia del anti-M6a-mAb produce la endocitosis de M6a. Con esto último presente, los estudios del trabajo de Liang y colaboradores fueron en presencia de la coestimulación del MOPr con DAMGO y de M6a con el anti-M6a-mAb. Los estudios aquí expuestos además aportan que, al menos en parte, M6a recupera su localización en la membrana por reciclado. Hemos observado que M6a comparte endosomas con Tf-647 y que al menos en parte se recicla por la vía lenta (Rab11), pero no podemos descartar que también lo haga por la vía rápida (Rab4) ya que no lo hemos determinado. Teniendo en mente la pérdida de M6a luego del WO tenemos que tener presente que los endosomas Rab11 podrían ser los sumideros de la vía exocítica de exosomas que abordaremos más adelante (Takahashi, y col., 2012).

Aquí hemos determinado que M6a, una vez endocitada, forma parte de endosomas tempranos (Rab5 y EEA-1). De forma similar, se ha detectado a PLP en endosomas tempranos Rab5 positivos (Trajkovic, y col., 2008). Como ya había sido descripto por Sato y por Liang y colaboradores, en su modelo de coestimulación, también detectamos a M6a en endosomas EEA-1 positivos (Liang, y col., 2008, Sato, y col., 2011b). Está aceptado que los endosomas tempranos son los principales centros clasificadores dentro de las células eucariotas. Es allí donde las proteínas son dirigidas por un lado hacia el reciclado y por otro hacia endosomas tardíos que podrían dar lugar a la degradación o la exocitosis (Kirkham and Parton, 2005, Vanlandingham and Ceresa, 2009, Merrifield and Kaksonen, 2014, Cousin, 2015, Neefjes, y col., 2017). Teniendo en cuenta que si los aminoácidos centrales del motivo de tirosina tienen características ácidas, como lo son el ácido glutámico (E) y aspártico (D), son capaces de redirigir las moléculas endocitadas hacia lisosomas o compartimientos relacionados con los lisosomas (Bonifacino and Dell'Angelica, 1999). En concordancia con estos antecedentes nosotros describimos que parte de M6a endocitada se localiza en parte en endosomas tardíos Rab7 positivos. Acorde con estos hallazgos, se ha descripto en nuestro laboratorio que M6a forma parte de la membrana de exosomas que podrían provenir de endosomas Rab11, Rab7 positivos o de MVB (CD63 positivos), (Monteleone, y col., 2017). Otros reportes han señalado que el receptor de neurotrofina p75 forma parte de endosomas tempranos (Rab5), de reciclado (Rab11) y en MVB, CD63 positivos. Ésto muestra un comportamiento poco común ya que sin pasar por endosomas tardíos se lo encuentra en MVB (Escudero, y col., 2014). De manera

contraria a lo descrito para p75, en la bibliografía se ha reportado que los endosomas tardíos Rab7 positivos podrían ser los sumideros de los MVB (Schmid, 2017). En este trabajo de tesis es la primera vez que se describe que M6a se encuentra en endosomas tempranos Rab5 positivos y tardíos Rab7 positivos luego del estímulo con el anti-M6a-mAb. En suma, estos antecedentes mencionados, indican que M6a, de forma similar a otras moléculas de membrana, es capaz de ser endocitada y su tránsito intracelular involucra tanto vías de reciclado como posiblemente vías degradativas o de exocitosis.

Hemos destacado que M6a no sólo se endocita sino que también una parte se recicla a la membrana plasmática. Sin embargo, hemos detectado que una parte se pierde durante el proceso. En este trabajo mostramos por citometría de flujo en neuronas de 1/2 DIV que luego del WO_{20h} alrededor del 20 % de M6a se perdió. Teniendo en cuenta este antecedente se presentan al menos dos escenarios posibles. Uno de ellos es que M6a podría degradarse luego de su endocitosis, otro podría deberse a la eliminación de M6a por exocitosis.

En este trabajo de tesis, hemos determinado la presencia de M6a con el marcador de endosomas ácidos LysoTracker® positivos. Más aún, determinamos también que M6a colocaliza con endosomas LAMP-1 positivos, en concordancia con los antecedentes citados. De forma contraria, el trabajo de Sato y colaboradores ha descrito que M6a se acumula en endosomas tempranos y no se detectó en endosomas LAMP-1 positivos cuando fue estimulada con el anti-M6a-1B4 (Sato, y col., 2011b). En este caso, los autores proponen que la inmunoestimulación de M6a con el anticuerpo 1B4 sería similar a la estimulación del anti-M6a-mAb. Sin embargo, los tiempos experimentales utilizados para esta evaluación difieren con los nuestros, ellos utilizaron 2 horas de inmunoestimulación en cambio nosotros utilizamos 1 hora.

Otros resultados aquí expuestos señalan que M6a disminuye su abundancia luego del WO_{4h} en el modelo de células HEK293-M6a-GFP, en presencia de cicloheximida. En este ensayo controlado se detectó una disminución significativa de la abundancia de GFP por citometría de flujo y por *Western blot*. Estos resultados acompañan, en parte, el hecho de que M6a se encontró en endosomas LAMP-1 positivos sugiriendo su degradación. Además, M6a podría estar sujeta a la degradación proteosomal ya que posee sitios predichos para ubiquitinación, como son las lisinas, en sus extremos citoplasmáticos (Jadhav and Wooten, 2009, Rosas, y col., 2018). Ésto lo proponemos teniendo en cuenta un trabajo reciente que ha reportado que M6a interacciona con el proteosoma facilitando su anclaje y actividad en la membrana (Ramachandran and Margolis, 2017). Cabe destacar, que en este trabajo de tesis es la primera vez que se describe la presencia de M6a en endosomas LAMP-1 positivos.

En relación a que M6a disminuya por exocitosis, en este trabajo documentamos que M6a

se encuentra por un lado en endosomas tardíos Rab7 positivos y por otro en endosomas Rab11 positivos. Teniendo en cuenta esto último, se ha propuesto en la bibliografía que los exosomas son mediadores de la comunicación entre células. Este mecanismo ha sido detectado desde organismos unicelulares hasta mamíferos. Esta estrategia propone que la composición de las membranas de los distintos exosomas podría estar relacionada con su *delivery* y acción en su célula diana (Lopez-Verrilli and Court, 2013). Datos bibliográficos han destacado distintos roles para los endosomas Rab11, ya hemos descrito la función de reciclado lento. En esta sección destacaremos otra función que es que pueden ser parte de la ruta de exocitosis formando parte de los sumideros de estas microvesículas (Budnik, y col., 2016). Sumado a esto, otros reportes señalan que los endosomas Rab7 también son sumideros de los exosomas (Schmid, 2017). Estos antecedentes mencionados concuerdan con resultados obtenidos en un trabajo de nuestro laboratorio donde se ha detectado a M6a presente en fracciones exosomales, CD63 positivas, obtenidas a partir de sobrenadantes de cultivo de neuronas transfectadas con M6a-GFP. Además en un modelo murino, han rescatado exosomas conteniendo a M6a a partir del suero de los animales (Monteleone, y col., 2017). En este mismo sentido, se ha detectado a PLP en fracciones exosomales, CD63 positivas, obtenidas a partir de sobrenadante de oligodendrocitos (Trajkovic, y col., 2008, Fruhbeis, y col., 2013). En el caso de PLP se ha reportado que los exosomas liberados por los oligodendrocitos podrían ser captados por las neuronas y de esta forma recibir señales. Y viceversa, se ha descrito para PLP que la adición de glutamato y agonistas selectivos de NMDA-R1 y AMPA a cultivos de oligodendrocitos, generaron una mayor cantidad de exosomas con mayor cantidad de PLP/DM20 en sus membranas (Fruhbeis, y col., 2013). Otros estudios señalan que el receptor de neurotrofinas p75, mediante una vía poco convencional, forma parte de exosomas provenientes de neuronas simpáticas. Además la adición de neurotrofina al cultivo produjo mayor cantidad de exosomas p75 positivos (Escudero, y col., 2014). Es sabido que la excreción de distintas moléculas en exosomas son utilizados como estrategia por distintos tipos celulares. Existen evidencias que destacan que estos exosomas pueden regular la señalización de las células que los incorporen (Taelman, y col., 2010, Dobrowolski and De Robertis, 2011). Un ejemplo de esto está relacionado a la liberación de p75 en exosomas por las células de Schwann lo que favorece la regeneración axonal (Lopez-Verrilli, y col., 2013). Teniendo estos antecedentes en cuenta podríamos especular que la participación de M6a en los exosomas podría tener variados propósitos para el organismo. Entonces, M6a no sólo podría ser redirigida hacia otras células vecinas sino que también hacia tejidos distantes. Asimismo, teniendo en cuenta antecedentes bibliográficos que señalan a las TTs como posibles moléculas moduladoras del

direccionamiento, fusión o endocitosis de los exosomas (Rana and Zoller, 2011), podríamos llegar a postular a M6a como un eventual marcador de su direccionamiento. Sin embargo, datos experimentales de nuestro laboratorio han mostrado que exosomas con M6a son capaces de ser captados por células COS-7 e inducir filopodios. Esto sugiere que para el caso de M6a, la internalización del exosoma-M6a positivo, provoca un efecto plástico en la célula receptora. Sería interesante indagar acerca de si el tratamiento neutralizante es capaz de aumentar la cantidad de exosomas M6a-positivos, o bien si aumenta la abundancia de M6a en los mismos.

En resumen, en este trabajo de tesis observamos que los niveles de M6a en la membrana plasmática neuronal determina el número de sinapsis por unidad de dendrita en cultivos de neuronas maduros. Mientras que su restitución, que no fue completa, a la membrana neuronal (WO_{20h}) se vio acompañada por la restitución del número de sinapsis activas por unidad de dendrita. En otras palabras, es necesaria la presencia de un nivel mínimo de M6a en la membrana plasmática neuronal para mantener el número de sinapsis.

Hasta el momento no se había estudiado la relación entre la endocitosis/reciclado de M6a en las membranas neuronales y las consecuencias funcionales que podrían provocar. Nuestra hipótesis, como hemos expuesto, se basó en que M6a posee un sistema endocítico característico que le permite modular su concentración en la membrana y de esta forma modula la formación y mantenimiento de las sinapsis. En este sentido, los estudios presentados en esta tesis aportan conocimiento novedoso acerca de la relación entre la estructura y la función de M6a con respecto a su endocitosis y reciclado. También, es la primera vez que se describe que el tránsito de M6a por la red endocítica, provocado por el tratamiento neutralizante, con el anti-M6a-mAb. Sumado a que, su endocitosis produjo la reducción de la cantidad de sinapsis por unidad de dendrita en neuronas hipocámpales en cultivo. Este mecanismo podría ser crítico durante el desarrollo neuronal, el podado sináptico (*pruning*) y/o en una variedad de desórdenes mentales en los cuáles el número de sinapsis se ve comprometido.

CONCLUSIONES

En este trabajo e tesis describimos por primera vez que la glicoproteína de membrana M6a se endocita ante el estímulo con el anti-M6a-mAb, que interacciona con su EC2. También describimos que una parte de M6a se recicla a la membrana y los niveles de M6a se restituyen en parte. Esto refuerza la idea de que el EC2 cumple un rol protagónico en las actividades plásticas en las que M6a participa. Nuestros resultados han mostrado que el tratamiento neutralizante disminuye el número de sinapsis las cuales se restituyen luego de eliminar el estímulo. En este sentido, la presencia de un nivel umbral de M6a en la membrana plasmática resulta ser crítico para la formación de sinapsis.

La endocitosis de M6a es dependiente de la EMC y la tirosina 251 está involucrada. Describimos que el tránsito intracelular de M6a involucra a endosomas tempranos (Rab5/EEA-1) y estaría sujeta, una parte, al reciclado lento (Rab11), mientras que otra parte se degradaría en lisosomas (Rab7/LAMP-1). M6a, luego del AIA, podría degradarse en endosomas LAMP-1 positivos, sin embargo, no podemos descartar que participe de otras vías que justifiquen su disminución.

Se ha descripto en el laboratorio que la expresión de M6a acompaña al desarrollo del individuo tanto en el hipocampo, la corteza prefrontal como en cerebelo de ratas desde el día de nacimiento hasta la edad juvenil, donde finalmente se mantienen constantes. Estos resultados apuntan a que la concentración de M6a en la superficie neuronal tiene implicancias en la modulación de la plasticidad neuronal. En este trabajo de tesis se ha estudiado parte del mecanismo de acción en el que M6a se encuentra involucrado. Nuestros estudios intentan brindar antecedentes acerca del mecanismo de acción endocítico que le permite a M6a mantener niveles necesarios en la membrana plasmática o bien ser redirigida hacia donde su función sea requerida y de esta manera asistir a la plasticidad neuronal.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams D.J., Arthur C.P., y col. (2015) Architecture of the Synaptophysin/Synaptobrevin Complex: Structural Evidence for an Entropic Clustering Function at the Synapse. *Scientific reports* 5:13659.
- Alfonso J., Aguero F., y col. (2004a) Gene expression analysis in the hippocampal formation of tree shrews chronically treated with cortisol. *J Neurosci Res* 78:702-710.
- Alfonso J., Fernandez M.E., y col. (2005a) The stress-regulated protein M6a is a key modulator for neurite outgrowth and filopodium/spine formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:17196-17201.
- Alfonso J., Frasch A.C., y col. (2005b) Chronic stress, depression and antidepressants: effects on gene transcription in the hippocampus. *Rev Neurosci* 16:43-56.
- Alfonso J., Frick L.R., y col. (2006) Regulation of hippocampal gene expression is conserved in two species subjected to different stressors and antidepressant treatments. *Biol Psychiatry* 59:244-251.
- Alfonso J., Pollevick G.D., y col. (2004b) Identification of genes regulated by chronic psychosocial stress and antidepressant treatment in the hippocampus. *Eur J Neurosci* 19:659-666.
- Alvarez Julia A., Frasch A.C., y col. (2016) Neuronal filopodium formation induced by the membrane glycoprotein M6a (Gpm6a) is facilitated by coronin-1a, Rac1, and p21-activated kinase 1 (Pak1). *J Neurochem* 137:46-61.
- Baj G., Patrizio A., y col. (2014) Developmental and maintenance defects in Rett syndrome neurons identified by a new mouse staging system in vitro. *Frontiers in cellular neuroscience* 8:18.
- Baumrind N.L., Parkinson D., y col. (1992) EMA: a developmentally regulated cell-surface glycoprotein of CNS neurons that is concentrated at the leading edge of growth cones. *Dev Dyn* 194:311-325.
- Boks M.P., Hoogendoorn M., y col. (2008) Do mood symptoms subdivide the schizophrenia phenotype? Association of the GMP6A gene with a depression subgroup. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B:707-711.
- Bolte S., Cordelieres F.P. (2006) A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of microscopy* 224:213-232.
- Bonifacino J.S., Dell'Angelica E.C. (1999) Molecular bases for the recognition of tyrosine-based sorting signals. *J Cell Biol* 145:923-926.
- Britt D.J., Farias G.G., y col. (2016) Mechanisms of Polarized Organelle Distribution in Neurons. *Frontiers in cellular neuroscience* 10:88.
- Brocco M.A., Fernandez M.E., y col. (2010) Filopodial protrusions induced by glycoprotein M6a exhibit high motility and aids synapse formation. *Eur J Neurosci* 31:195-202.
- Budnik V., Ruiz-Canada C., y col. (2016) Extracellular vesicles round off communication in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 17:160-172.
- Caceres A., Ye B., y col. (2012) Neuronal polarity: demarcation, growth and commitment. *Current opinion in cell biology* 24:547-553.
- Camps J., Nguyen Q.T., y col. (2009) Integrative genomics reveals mechanisms of copy number alterations responsible for transcriptional deregulation in colorectal cancer. *Genes, chromosomes & cancer* 48:1002-1017.
- Ceresa B.P., Kao A.W., y col. (1998) Inhibition of clathrin-mediated endocytosis selectively attenuates specific insulin receptor signal transduction pathways. *Mol Cell Biol* 18:3862-3870.
- Ciechanover A. (2005) Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:79-87.

- Conti F., Sertic S., y col. (2009) Intracellular trafficking of the human oxytocin receptor: evidence of receptor recycling via a Rab4/Rab5 "short cycle". *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 296:E532-542.
- Cooper B., Werner H.B., y col. (2008) Glycoprotein M6a is present in glutamatergic axons in adult rat forebrain and cerebellum. *Brain Res* 1197:1-12.
- Cosker K.E., Segal R.A. (2014) Neuronal signaling through endocytosis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 6.
- Cousin M.A. (2015) Synaptic Vesicle Endocytosis and Endosomal Recycling in Central Nerve Terminals: Discrete Trafficking Routes? *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 21:413-423.
- Chen C.L., Hou W.H., y col. (2009) Inhibitors of clathrin-dependent endocytosis enhance TGFbeta signaling and responses. *J Cell Sci* 122:1863-1871.
- Cheung G., Jupp O.J., y col. (2010) Activity-dependent bulk endocytosis and clathrin-dependent endocytosis replenish specific synaptic vesicle pools in central nerve terminals. *J Neurosci* 30:8151-8161.
- Christoforidis S., McBride H.M., y col. (1999) The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature* 397:621-625.
- Daffu G., Sohi J., y col. (2012) Proteolipid protein dimerization at cysteine 108: Implications for protein structure. *Neurosci Res* 74:144-155.
- de Araujo M.E., Huber L.A., y col. (2008) Isolation of endocytic organelles by density gradient centrifugation. *Methods Mol Biol* 424:317-331.
- Deinhardt K., Reversi A., y col. (2007) Neurotrophins Redirect p75NTR from a clathrin-independent to a clathrin-dependent endocytic pathway coupled to axonal transport. *Traffic* 8:1736-1749.
- Dinkel H., Van Roey K., y col. (2016) ELM 2016--data update and new functionality of the eukaryotic linear motif resource. *Nucleic Acids Res* 44:D294-300.
- Dobrowolski R., De Robertis E.M. (2011) Endocytic control of growth factor signalling: multivesicular bodies as signalling organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:53-60.
- Dotti C.G., Sullivan C.A., y col. (1988) The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 8:1454-1468.
- Drabek K., van de Peppel J., y col. (2011) GPM6B regulates osteoblast function and induction of mineralization by controlling cytoskeleton and matrix vesicle release. *J Bone Miner Res* 26:2045-2051.
- Duffield A., Kamsteeg E.J., y col. (2003) The tetraspanin CD63 enhances the internalization of the H,K-ATPase beta-subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15560-15565.
- El-Kordi A., Kastner A., y col. (2013) A single gene defect causing claustrophobia. *Transl Psychiatry* 3:e254.
- Ellison K.A., Fill C.P., y col. (1992) Examination of X chromosome markers in Rett syndrome: exclusion mapping with a novel variation on multilocus linkage analysis. *American journal of human genetics* 50:278-287.
- Escudero C.A., Lazo O.M., y col. (2014) The p75 neurotrophin receptor evades the endolysosomal route in neuronal cells, favouring multivesicular bodies specialised for exosomal release. *J Cell Sci* 127:1966-1979.
- Esteves da Silva M., Adrian M., y col. (2015) Positioning of AMPA Receptor-Containing Endosomes Regulates Synapse Architecture. *Cell reports* 13:933-943.
- Fan G.H., Zhao J., y col. (1998) N-Methyl-D-aspartate attenuates opioid receptor-mediated G protein activation and this process involves protein kinase C. *Mol Pharmacol* 53:684-690.
- Farias G.G., Cuitino L., y col. (2012) Signal-mediated, AP-1/clathrin-dependent sorting

- of transmembrane receptors to the somatodendritic domain of hippocampal neurons. *Neuron* 75:810-823.
- Fernandez M.E., Alfonso J., y col. (2010) Conserved cellular function and stress-mediated regulation among members of the proteolipid protein family. *J Neurosci Res* 88:1298-1308.
- Fjorback A.W., Muller H.K., y col. (2009) Membrane glycoprotein M6B interacts with the human serotonin transporter. *Journal of molecular neuroscience : MN* 37:191-200.
- Formoso K., Billi S.C., y col. (2015a) Tyrosine 251 at the C-terminus of neuronal glycoprotein M6a is critical for neurite outgrowth. *J Neurosci Res* 93:215-229.
- Formoso K., Garcia M.D., y col. (2015b) Filopodia formation driven by membrane glycoprotein M6a depends on the interaction of its transmembrane domains. *J Neurochem* 134:499-512.
- Formoso K., Garcia M.D., y col. (2016) Evidence for a role of glycoprotein M6a in dendritic spine formation and synaptogenesis. *Molecular and cellular neurosciences* 77:95-104.
- Forrest M.P., Parnell E., y col. (2018) Dendritic structural plasticity and neuropsychiatric disease. *Nat Rev Neurosci* 19:215-234.
- Fruhbeis C., Frohlich D., y col. (2013) Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication. *PLoS biology* 11:e1001604.
- Fuchsova B., Alvarez Julia A., y col. (2015) Altered expression of neuroplasticity-related genes in the brain of depressed suicides. *Neuroscience* 299:1-17.
- Fuchsova B., Fernandez M.E., y col. (2009) Cysteine residues in the large extracellular loop (EC2) are essential for the function of the stress-regulated glycoprotein M6a. *J Biol Chem* 284:32075-32088.
- Garbern J., Cambi F., y col. (1999) The molecular pathogenesis of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Archives of neurology* 56:1210-1214.
- Garbern J.Y. (2005) Pelizaeus-Merzbacher disease: pathogenic mechanisms and insights into the roles of proteolipid protein 1 in the nervous system. *J Neurol Sci* 228:201-203.
- Garbern J.Y. (2007) Pelizaeus-Merzbacher disease: Genetic and cellular pathogenesis. *Cell Mol Life Sci* 64:50-65.
- Goswami T., Li X., y col. (2012) Comparative phosphoproteomic analysis of neonatal and adult murine brain. *Proteomics* 12:2185-2189.
- Greenwood T.A., Akiskal H.S., y col. (2012) Genome-wide association study of temperament in bipolar disorder reveals significant associations with three novel Loci. *Biol Psychiatry* 72:303-310.
- Gregor A., Kramer J.M., y col. (2014) Altered GPM6A/M6 dosage impairs cognition and causes phenotypes responsive to cholesterol in human and *Drosophila*. *Human mutation* 35:1495-1505.
- Griffiths I., Klugmann M., y col. (1998) Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *Science* 280:1610-1613.
- Harding C., Heuser J., y col. (1983) Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol* 97:329-339.
- Harlow D.E., Saul K.E., y col. (2014) Expression of proteolipid protein gene in spinal cord stem cells and early oligodendrocyte progenitor cells is dispensable for normal cell migration and myelination. *J Neurosci* 34:1333-1343.
- Harris K.M., Weinberg R.J. (2012) Ultrastructure of synapses in the mammalian brain. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4.
- Hassuna N., Monk P.N., y col. (2009) Strategies for targeting tetraspanin proteins:

- potential therapeutic applications in microbial infections. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy* 23:341-359.
- Hemler M.E. (2008) Targeting of tetraspanin proteins--potential benefits and strategies. *Nature reviews Drug discovery* 7:747-758.
- Hobson G.M., Garbern J.Y. (2012) Pelizaeus-Merzbacher disease, Pelizaeus-Merzbacher-like disease 1, and related hypomyelinating disorders. *Seminars in neurology* 32:62-67.
- Homsy Y., Lang T. (2017) The specificity of homomeric clustering of CD81 is mediated by its delta-loop. *FEBS open bio* 7:274-283.
- Honda A., Ito Y., y col. (2017a) Extracellular Signals Induce Glycoprotein M6a Clustering of Lipid Rafts and Associated Signaling Molecules. *J Neurosci* 37:4046-4064.
- Honda A., Usui H., y col. (2017b) Rufy3 is an adapter protein for small GTPases that activates a Rac guanine nucleotide exchange factor to control neuronal polarity. *J Biol Chem* 292:20936-20946.
- Hotulainen P., Hoogenraad C.C. (2010) Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *J Cell Biol* 189:619-629.
- Huang K.Y., Chen G.D., y col. (2011) Phosphorylation of the zebrafish M6Ab at serine 263 contributes to filopodium formation in PC12 cells and neurite outgrowth in zebrafish embryos. *PLoS One* 6:e26461.
- Hueffer K., Palermo L.M., y col. (2004) Parvovirus infection of cells by using variants of the feline transferrin receptor altering clathrin-mediated endocytosis, membrane domain localization, and capsid-binding domains. *J Virol* 78:5601-5611.
- Human Gene Database G.C. (2018) Gene Cards <https://www.genecards.org>.
- Huminiecki L L.A., Wolfe KH (2003) Congruence of tissue expression profiles from Gene Expression Atlas, SAGEmañ and Tissue Info databases. *BMC Genomics* 4:31.
- Huotari J., Helenius A. (2011) Endosome maturation. *EMBO J* 30:3481-3500.
- Iacopetta B.J., Morgan E.H. (1983) The kinetics of transferrin endocytosis and iron uptake from transferrin in rabbit reticulocytes. *J Biol Chem* 258:9108-9115.
- Ippolito D.M., Eroglu C. (2010) Quantifying synapses: an immunocytochemistry-based assay to quantify synapse number. *J Vis Exp*.
- Ito Y., Honda A., y col. (2018) Glycoprotein M6a as a signaling transducer in neuronal lipid rafts. *Neurosci Res* 128:19-24.
- Jadhav T., Wooten M.W. (2009) Defining an Embedded Code for Protein Ubiquitination. *Journal of proteomics & bioinformatics* 2:316.
- Jung S.S., Nalbantoglu J., y col. (1996) Alzheimer's beta-amyloid precursor protein is expressed on the surface of immediately ex vivo brain cells: a flow cytometric study. *J Neurosci Res* 46:336-348.
- Kadlecova Z., Spielman S.J., y col. (2017) Regulation of clathrin-mediated endocytosis by hierarchical allosteric activation of AP2. *J Cell Biol* 216:167-179.
- Kang R., Wan J., y col. (2008) Neural palmitoyl-proteomics reveals dynamic synaptic palmitoylation. *Nature* 456:904-909.
- Kawauchi T., Sekine K., y col. (2010) Rab GTPases-dependent endocytic pathways regulate neuronal migration and maturation through N-cadherin trafficking. *Neuron* 67:588-602.
- Keil R., Hatzfeld M. (2014) The armadillo protein p0071 is involved in Rab11-dependent recycling. *J Cell Sci* 127:60-71.
- Kirkham M., Parton R.G. (2005) Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochim Biophys Acta* 1746:349-

- 363.
- Klugmann M., Schwab M.H., y col. (1997) Assembly of CNS myelin in the absence of proteolipid protein. *Neuron* 18:59-70.
- Kolb B., Muhammad A., y col. (2011) Searching for factors underlying cerebral plasticity in the normal and injured brain. *Journal of communication disorders* 44:503-514.
- Kovalenko O.V., Yang X.H., y col. (2007) A novel cysteine cross-linking method reveals a direct association between claudin-1 and tetraspanin CD9. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 6:1855-1867.
- Kramer-Albers E.M., Gehrig-Burger K., y col. (2006) Perturbed interactions of mutant proteolipid protein/DM20 with cholesterol and lipid rafts in oligodendroglia: implications for dysmyelination in spastic paraplegia. *J Neurosci* 26:11743-11752.
- Kwon S.E., Chapman E.R. (2011) Synaptophysin regulates the kinetics of synaptic vesicle endocytosis in central neurons. *Neuron* 70:847-854.
- Lachen-Montes M., Gonzalez-Morales A., y col. (2016) An early dysregulation of FAK and MEK/ERK signaling pathways precedes the beta-amyloid deposition in the olfactory bulb of APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of proteomics* 148:149-158.
- Lagenaur C., Kunemund V., y col. (1992) Monoclonal M6 antibody interferes with neurite extension of cultured neurons. *J Neurobiol* 23:71-88.
- Lau C.G., Zukin R.S. (2007) NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 8:413-426.
- Lazo O.M., Gonzalez A., y col. (2013) BDNF regulates Rab11-mediated recycling endosome dynamics to induce dendritic branching. *J Neurosci* 33:6112-6122.
- Leterrier C., Bonnard D., y col. (2004) Constitutive endocytic cycle of the CB1 cannabinoid receptor. *J Biol Chem* 279:36013-36021.
- LeVine S.M., Wong D., y col. (1990) Developmental expression of proteolipid protein and DM20 mRNAs and proteins in the rat brain. *Developmental neuroscience* 12:235-250.
- Levy S., Shoham T. (2005) The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nat Rev Immunol* 5:136-148.
- Liang Y.J., Wu D.F., y col. (2008) Membrane glycoprotein M6A promotes mu-opioid receptor endocytosis and facilitates receptor sorting into the recycling pathway. *Cell Res* 18:768-779.
- Liu C.C., Kanekiyo T., y col. (2014) Tyrosine-based signal mediates LRP6 receptor endocytosis and desensitization of Wnt/beta-catenin pathway signaling. *J Biol Chem* 289:27562-27570.
- Lopez-Verrilli M.A., Court F.A. (2013) Exosomes: mediators of communication in eukaryotes. *Biological research* 46:5-11.
- Lopez-Verrilli M.A., Picou F., y col. (2013) Schwann cell-derived exosomes enhance axonal regeneration in the peripheral nervous system. *Glia* 61:1795-1806.
- Ma C., Gu C., y col. (2018) The integrated landscape of causal genes and pathways in schizophrenia. *Transl Psychiatry* 8:67.
- Maxfield F.R., McGraw T.E. (2004) Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:121-132.
- Mayor S., Pagano R.E. (2007) Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:603-612.
- McMahon H.T., Boucrot E. (2011) Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12:517-533.
- Merrifield C.J., Kaksonen M. (2014) Endocytic accessory factors and regulation of

- clathrin-mediated endocytosis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 6:a016733.
- Meunier F.A., Gutierrez L.M. (2016) Captivating New Roles of F-Actin Cortex in Exocytosis and Bulk Endocytosis in Neurosecretory Cells. *Trends in neurosciences* 39:605-613.
- Michibata H., Okuno T., y col. (2009) Human GPM6A is associated with differentiation and neuronal migration of neurons derived from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 18:629-639.
- Michibata H., Okuno T., y col. (2008) Inhibition of mouse GPM6A expression leads to decreased differentiation of neurons derived from mouse embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 17:641-651.
- Miserey-Lenkei S., Lenkei Z., y col. (2001) A functional enhanced green fluorescent protein (EGFP)-tagged angiotensin II at(1a) receptor recruits the endogenous Galphaq/11 protein to the membrane and induces its specific internalization independently of receptor-g protein coupling in HEK-293 cells. *Molecular endocrinology* 15:294-307.
- Mita S., de Monasterio-Schrader P., y col. (2015) Transcallosal Projections Require Glycoprotein M6-Dependent Neurite Growth and Guidance. *Cerebral cortex* 25:4111-4125.
- Monteleone M.C., Adrover E., y col. (2014) Prenatal stress changes the glycoprotein GPM6A gene expression and induces epigenetic changes in rat offspring brain. *Epigenetics* 9:152-160.
- Monteleone M.C., Billi S.C., y col. (2017) Neural glycoprotein M6a is released in extracellular vesicles and modulated by chronic stressors in blood. *Scientific reports* 7:9788.
- Morrison A.C., Felix J.F., y col. (2010) Genomic variation associated with mortality among adults of European and African ancestry with heart failure: the cohorts for heart and aging research in genomic epidemiology consortium. *Circulation Cardiovascular genetics* 3:248-255.
- Mukobata S., Hibino T., y col. (2002) M6a acts as a nerve growth factor-gated Ca(2+) channel in neuronal differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 297:722-728.
- Murphy D.L., Lerner A., y col. (2004) Serotonin transporter: gene, genetic disorders, and pharmacogenetics. *Molecular interventions* 4:109-123.
- Narayanan V., Olinsky S., y col. (1998) Mutation analysis of the M6b gene in patients with Rett syndrome. *American journal of medical genetics* 78:165-168.
- Neefjes J., Jongsma M.M.L., y col. (2017) Stop or Go? Endosome Positioning in the Establishment of Compartment Architecture, Dynamics, and Function. *Trends Cell Biol* 27:580-594.
- Niciu M.J., Kelmendi B., y col. (2012) Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 100:656-664.
- Olinsky S., Loop B.T., y col. (1996) Chromosomal mapping of the human M6 genes. *Genomics* 33:532-536.
- Pandey K.N. (2009) Functional roles of short sequence motifs in the endocytosis of membrane receptors. *Frontiers in bioscience* 14:5339-5360.
- Park M.H., Kwak S.H., y col. (2013) Identification of a genetic locus on chromosome 4q34-35 for type 2 diabetes with overweight. *Experimental & molecular medicine* 45:e7.
- Parton R.G., Dotti C.G. (1993) Cell biology of neuronal endocytosis. *J Neurosci Res* 36:1-9.
- Penzes P., Cahill M.E., y col. (2011) Dendritic spine pathology in neuropsychiatric

- disorders. *Nature neuroscience* 14:285-293.
- Pike J.A., Styles I.B., y col. (2017) Quantifying receptor trafficking and colocalization with confocal microscopy. *Methods* 115:42-54.
- Prieto D., Aparicio G., y col. (2014) A fast, low cost, and highly efficient fluorescent DNA labeling method using methyl green. *Histochemistry and cell biology* 142:335-345.
- Pula G., Mundell S.J., y col. (2005) Analysis of mGluR1a constitutive internalization using a pulse-chase enzyme-linked immuno-sorbant assay (ELISA). *Journal of biochemical and biophysical methods* 64:167-181.
- Rajesh S., Sridhar P., y col. (2012) Structural basis of ligand interactions of the large extracellular domain of tetraspanin CD81. *J Virol* 86:9606-9616.
- Ramachandran K.V., Margolis S.S. (2017) A mammalian nervous-system-specific plasma membrane proteasome complex that modulates neuronal function. *Nature structural & molecular biology* 24:419-430.
- Rana S., Zoller M. (2011) Exosome target cell selection and the importance of exosomal tetraspanins: a hypothesis. *Biochem Soc Trans* 39:559-562.
- Ribet D., Cossart P. (2010) Post-translational modifications in host cells during bacterial infection. *FEBS Lett* 584:2748-2758.
- Robinson M.S. (2015) Forty Years of Clathrin-coated Vesicles. *Traffic* 16:1210-1238.
- Roboti P., Swanton E., y col. (2009) Differences in endoplasmic-reticulum quality control determine the cellular response to disease-associated mutants of proteolipid protein. *J Cell Sci* 122:3942-3953.
- Rodal S.K., Skretting G., y col. (1999) Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol Biol Cell* 10:961-974.
- Rodriguez-Walker M., Vilcaes A.A., y col. (2015) Role of plasma-membrane-bound sialidase NEU3 in clathrin-mediated endocytosis. *Biochem J* 470:131-144.
- Rosas N.M., Alvarez Julia A., y col. (2018) Alanine Scanning Mutagenesis of the C-Terminal Cytosolic End of Gpm6a Identifies Key Residues Essential for the Formation of Filopodia. *Frontiers in molecular neuroscience* 11:314.
- Roselli F., Hutzler P., y col. (2009) Disassembly of shank and homer synaptic clusters is driven by soluble beta-amyloid(1-40) through divergent NMDAR-dependent signalling pathways. *PLoS One* 4:e6011.
- Roussel G., Trifilieff E., y col. (1998) Immunoelectron microscopic localization of the M6a antigen in rat brain. *Journal of neurocytology* 27:695-703.
- Sanchez-Roige S., Fontanillas P., y col. (2018) Genome-wide association study of delay discounting in 23,217 adult research participants of European ancestry. *Nature neuroscience* 21:16-18.
- Sato Y., Mita S., y col. (2011a) Induction of axon growth arrest without growth cone collapse through the N-terminal region of four-transmembrane glycoprotein M6a. *Dev Neurobiol* 71:733-746.
- Sato Y., Watanabe N., y col. (2011b) Actin-independent behavior and membrane deformation exhibited by the four-transmembrane protein M6a. *PLoS One* 6:e26702.
- Scorticati C., Formoso K., y col. (2011) Neuronal glycoprotein M6a induces filopodia formation via association with cholesterol-rich lipid rafts. *J Neurochem* 119:521-531.
- Schindelin J., Arganda-Carreras I., y col. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods* 9:676-682.
- Schmid S.L. (2017) Reciprocal regulation of signaling and endocytosis: Implications for

- the evolving cancer cell. *J Cell Biol* 216:2623-2632.
- Sekino Y., Kojima N., y col. (2007) Role of actin cytoskeleton in dendritic spine morphogenesis. *Neurochemistry international* 51:92-104.
- Simons M., Kramer E.M., y col. (2000) Assembly of myelin by association of proteolipid protein with cholesterol- and galactosylceramide-rich membrane domains. *J Cell Biol* 151:143-154.
- Simonsen A., Lippe R., y col. (1998) EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature* 394:494-498.
- Smythe E., Ayscough K.R. (2006) Actin regulation in endocytosis. *J Cell Sci* 119:4589-4598.
- Sobo K., Le Blanc I., y col. (2007) Late endosomal cholesterol accumulation leads to impaired intra-endosomal trafficking. *PLoS One* 2:e851.
- Sonnichsen B., De Renzis S., y col. (2000) Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J Cell Biol* 149:901-914.
- Stipp C.S., Kolesnikova T.V., y col. (2003) Functional domains in tetraspanin proteins. *Trends in biochemical sciences* 28:106-112.
- Taelman V.F., Dobrowolski R., y col. (2010) Wnt signaling requires sequestration of glycogen synthase kinase 3 inside multivesicular endosomes. *Cell* 143:1136-1148.
- Takahashi S., Kubo K., y col. (2012) Rab11 regulates exocytosis of recycling vesicles at the plasma membrane. *J Cell Sci* 125:4049-4057.
- Takamori S., Holt M., y col. (2006) Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* 127:831-846.
- Trajkovic K., Hsu C., y col. (2008) Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 319:1244-1247.
- Traub L.M., Bonifacino J.S. (2013) Cargo recognition in clathrin-mediated endocytosis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5:a016790.
- van Deventer S.J., Dunlock V.E., y col. (2017) Molecular interactions shaping the tetraspanin web. *Biochem Soc Trans* 45:741-750.
- Vanlandingham P.A., Ceresa B.P. (2009) Rab7 regulates late endocytic trafficking downstream of multivesicular body biogenesis and cargo sequestration. *J Biol Chem* 284:12110-12124.
- Werner H., Dimou L., y col. (2001) Multiple splice isoforms of proteolipid M6B in neurons and oligodendrocytes. *Molecular and cellular neurosciences* 18:593-605.
- Werner H.B., Kramer-Albers E.M., y col. (2013) A critical role for the cholesterol-associated proteolipids PLP and M6B in myelination of the central nervous system. *Glia* 61:567-586.
- White R., Kramer-Albers E.M. (2014) Axon-glia interaction and membrane traffic in myelin formation. *Frontiers in cellular neuroscience* 7:284.
- Winterstein C., Trotter J., y col. (2008) Distinct endocytic recycling of myelin proteins promotes oligodendroglial membrane remodeling. *J Cell Sci* 121:834-842.
- Wu D.F., Koch T., y col. (2007) Membrane glycoprotein M6a interacts with the micro-opioid receptor and facilitates receptor endocytosis and recycling. *J Biol Chem* 282:22239-22247.
- Yaffe Y., Hugger I., y col. (2015) The myelin proteolipid plasmalogen forms oligomers and induces liquid-ordered membranes in the Golgi complex. *J Cell Sci* 128:2293-2302.
- Yamanaka K., Vande Velde C., y col. (2003) Unstable mutants in the peripheral endosomal membrane component ALS2 cause early-onset motor neuron disease.

- Proc Natl Acad Sci U S A 100:16041-16046.
- Yan Y., Narayanan V., y col. (1996) Expression of members of the proteolipid protein gene family in the developing murine central nervous system. *J Comp Neurol* 370:465-478.
- Yim Y.I., Scarselletta S., y col. (2005) Exchange of clathrin, AP2 and epsin on clathrin-coated pits in permeabilized tissue culture cells. *J Cell Sci* 118:2405-2413.
- Yuste R., Bonhoeffer T. (2004) Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nat Rev Neurosci* 5:24-34.
- Zappia M.P., Billi S.C., y col. (2012) The membrane protein M6 is involved in the response to light in *Drosophila*. Submitted.
- Zappia M.P., Brocco M.A., y col. (2011) M6 membrane protein plays an essential role in *Drosophila* oogenesis. *PLoS One* 6:e19715.
- Zhang X., Xie H., y col. (2018) Glycoprotein M6B Interacts with TbetaRI to Activate TGF-beta-Smad2/3 Signaling and Promote Smooth Muscle Cell Differentiation. Stem cells.
- Zhao J., Iida A., y col. (2008) M6a is expressed in the murine neural retina and regulates neurite extension. *Mol Vis* 14:1623-1630.

AGRADECIMIENTOS

Para comenzar quiero agradecer a las instituciones que hicieron posible mi formación. Empezando por la educación pública que desde la primera infancia, primario y secundario me ofrecieron un espacio valiosísimo. Sin la educación pública este recorrido no hubiera sido posible. Para continuar, quiero destacar mi formación universitaria, que la realicé en la Universidad Nacional de General San Martín. Esta institución me ofreció una valiosa formación como Licenciada en Biotecnología. Además, me proporcionó un espacio que se convirtió en muchos años en mi segundo hogar. Gracias a la Beca Bicentenario, otorgada por el Ministerio de Ciencia y Tecnología, que recibí durante dos años, pude llevar adelante el último año de carrera y la tesis de grado. A lo largo de la carrera he conocido profesionales que han logrado mostrarme lo fascinante que resulta la investigación. Asimismo, han sabido guiarme hacia un camino de dedicación y amor por la ciencia. Más tarde, el Instituto de Investigaciones Biotecnológicas me ha ofrecido la posibilidad de hacer un doctorado en Biología Molecular y Biotecnología en el laboratorio de neurobiología a cargo del Dr. Frasch. Luego en el laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular de la Dra. Camila Scorticati. Quiero destacar el rol de mis directores Dra. Camila Scorticati y Dr. Alberto Carlos C. Frasch y agradecerles por haber confiado en mí, su guía en el doctorado y ofrecerme oportunidades de formación.

Este camino de 5 años y medio ha sido posible gracias a que he recibido financiamiento de distintas instituciones. En primer lugar, por tres años recibí una beca inicial doctoral de la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica. En segundo lugar, fui beneficiada con una beca Puente de la UNSAM por 6 meses. Y por último he obtenido una beca de Finalización de doctorado del CONICET por dos años. Durante mi formación he asistido a congresos nacionales e internacionales. Algunos de ellos financiados por la ISN (*International Society for Neurochemistry*), IBRO (*International Brain Research Organization*), y FALAN (Federación Latinoamericana de Neurociencias). Además, he recibido financiamiento para la realización de cursos de posgrado internacionales de IBRO y el Instituto Pasteur de Montevideo. A todas estas instituciones les estoy muy agradecida.

Ahora hablando de aspectos individuales, la etapa del doctorado la viví como el tránsito a una meta que anhelaba. Pero como todo sueño llevado a la realidad es un poco distinto a lo que uno se puede imaginar. Siempre supe que tendría que esforzarme, pero, al transitar los intrincados caminos que los doctorados proponen, tuve que poner más y

más esfuerzo. Encontré espacios de aprendizaje a todo nivel. Con esto me refiero, aprendizajes a nivel académico, personal, humano, amistades, administrativos y también aprendí a convivir con la frustración. Más de un lector de este manuscrito sabrá de lo que estoy hablando. El doctorado, según mi parecer, se basa en la aparición, casi a diario, de una nueva frustración, de las cuales hay que reponerse y seguir adelante. En medio de todo eso, hay que ser capaz de reconocer los pequeños éxitos que normalmente son los que persisten. Muchos de los resultados negativos y los errores, los dejamos a un costado. A un costado pero no muy lejos, ya que nos servirán de experiencia acumulada para construir a partir de eso también. Quizás para construir sabiendo que escalones no pisar. En esta etapa quiero destacar el rol de mis directores y compañeros de laboratorio quienes me han brindado un lugar de trabajo, los recursos y la guía académica. Sumado al grupo humano del laboratorio que han ofrecido no sólo ayuda en los experimentos, sino sostén y por sobretodo compañerismo.

Respecto de lo personal tendría muchos aspectos que mencionar. Sin embargo, elegí destacar algunas personas que han aportado de alguna manera o de otra a la progresión y evolución de esta tesis. En primer lugar a mi familia, mis padres han aportado dándome las herramientas y fuerzas hace muchos años pero siguen intactas en mí. Mis hermanas Mari y Picu y sus familias han sido, desde la distancia, grandes escuchadores, contenedores y consejeros. En resumen grandes apoyos. A una mujer con la que hemos compartido de las cosas más importantes de la vida: mi abuela. Lili ha sido una gran compañera en los momentos duros y también en los festejos. Celebro que hayamos podido compartir gran parte de esta aventura juntas. Una gran mujer que me enseñó y dejó inmensos legados en mí.

A mi gran compañero de ruta, Martín, con quien hemos aprendido a ser todo lo que necesitamos para siempre seguir adelante sorteando las piedras de la vida y festejando los buenos momentos y los logros alcanzados. Quién me enseñó que existen los grises y que en el camino se van definiendo las cosas. A su familia, que me la presta y la tomo como mía. Tere y Rodolfo son dos grandes ejemplos que me muestran, cada vez que lo necesito, realidades diferentes, puntos de vista distintos. Ellos me brindan un gran apoyo y guía de forma cariñosa y con las palabras justas. Javi, Mimu, Seba, Uli, Litex y Oma con quienes compartimos infinidad de momentos. Esa buena gente con la que sabes que vas a contar siempre! Vivi, Fer, Bele y Santi que también forman la tropa de los viernes. A todos ellos les agradezco por poner ese toque de familia y calidez a mi vida.

A mis grandes amigos que sin sus consejos, retos, risas, cuidados, enojos y sorpresas

la vida sería mucho más aburrida. En particular a Piper, Pau, Dai, Fabri, Pablo y Kari (Serjoshian).

A la gente maravillosa que conocí en el camino del doctorado sin la cual todo este tránsito hubiera sido seguro menos divertido. A esos con los que he compartido largas jornadas de trabajo Kari, Meli, Sil, Gianni, Sol, Carli y Analía. Sil ha sido como la mamá de laboratorio a quién siempre pude recurrir. Kari, mi gran compañera que me enseñó tanto, no sólo en la mesada. Me enseñó desde su generosidad y buena piba que es. Los infaltables del mate y buenos consejeros, Solci, Gianni, Euge, Ana, Gabi, Nico, Sofi, Mei, Pauli, Ara, Anabel y Lean. Al labo de neuro: Marce y Bea. A los amigos que me dio la UNSAM y la UBA Vero, Sabri, Sam, Cele, Ramiro, Lucha y Mica.

Al laboratorio del Dr. Arregui que ha aportado desde consejos y mates hasta equipos y reactivos. Al laboratorio del Dr. Campetella que nos han prestado reactivos y equipos a lo largo de todo el doctorado. No quiero dejar de mencionar al personal de asistencia técnica del laboratorio que sin ellos todo nuestro trabajo sería muchísimo más difícil. A las personas de administración sin las cuales este tránsito hubiera sido aún mucho más empinado. A quienes me ayudaron con la escritura: Vanina, Juan, Meli, Gabi, Kari, Sil, Tere, Javi, Mimu y Martín.

Por último quiero además de decir gracias, destacar que sin el apoyo enorme que recibí en el tránsito esta tesis ¡no hubiera sido posible!

NOTAS
